

Tesis Doctoral

Sondas fluorescentes para marcación y localización de proteínas en microscopías de súper resolución

Szalai, Alan Marcelo

2018

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Szalai, Alan Marcelo. (2018). Sondas fluorescentes para marcación y localización de proteínas en microscopías de súper resolución. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6391_Szalai

Cita tipo Chicago:

Szalai, Alan Marcelo. "Sondas fluorescentes para marcación y localización de proteínas en microscopías de súper resolución". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6391_Szalai

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Sondas fluorescentes para marcación y localización de proteínas en microscopías de súper resolución

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física

Alan Marcelo Szalai

Director de Tesis: **Dr. Pedro Francisco Aramendía**

Consejero de Estudios: **Dr. Galo Soler Ilia**

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones en Bio-Nanociencias Elizabeth Jares-Erijman (CIBION)-CONICET

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2018

Sondas fluorescentes para marcación y localización de proteínas en microscopías de súper resolución

El objetivo general de este trabajo de tesis fue obtener sondas fluorescentes adecuadas para el marcado de biomoléculas y para su uso en técnicas de microscopía de fluorescencia de súper-resolución. Por un lado, se estudió el comportamiento de una serie de 3-hidroxicromonas (3-HC), sustituidas en dos posiciones clave de la estructura principal con grupos dadores y aceptores de electrones. Estos compuestos presentan una reacción de transferencia de protón en estado excitado (ESIPT, por sus siglas en inglés) que da lugar a una emisión dual proveniente de los dos tautómeros. La posición espectral y la relación de intensidades de las bandas N* (forma normal en estado excitado) y T* (forma tautomérica) dependen de las propiedades del entorno. Por tal motivo, con frecuencia las 3-HC se utilizan para estudiar cambios estructurales en sistemas celulares. El entendimiento del origen de su emisión dual, la evaluación de la magnitud de los corrimientos espectrales y el conocimiento de los tiempos característicos de estado excitado en relación a la estructura resulta de especial interés. En este trabajo se caracterizó la dependencia de la intensidad de las bandas N* y T* con las propiedades del solvente y la temperatura. En base a estos resultados y a cálculos de estructura electrónica se interpretó la influencia de los sustituyentes aceptores y dadores de electrones en las posiciones clave estudiadas. También se realizaron estudios resueltos en el tiempo que permitieron arrojar luz sobre el mecanismo por el cual se forman ambas especies N* y T*, determinando experimentalmente el valor de las constantes cinéticas involucradas, cuyos valores varían entre 10 picosegundos y unos pocos nanosegundos.

Por otro lado, se estudió la marcación de un receptor de membrana, el receptor de la hormona liberadora de corticotropina de tipo 1 (CRHR1), un GPCR de clase B. Como marcador se utilizó un antagonista que se propuso en base a estudios de *docking* que predijeron una interacción favorable con el receptor. El compuesto sintetizado, ABP-09, es un aza-BODIPY y posee propiedades adecuadas para microscopías de super-resolución, debido a su estabilidad fotofísica y fotoquímica, su elevado rendimiento cuántico de fluorescencia y su capacidad de pasar a estados oscuros en forma intermitente. Su desempeño para la técnica de Microscopía Óptica de Reconstrucción Estocástica (STORM, por sus siglas en inglés) es comparable al de las sondas mayormente utilizadas en dicha técnica. Por estudios en células hipocámpales se pudo verificar que ABP-09 presenta una actividad como antagonista de CRHR1 comparable a la de CP-376395, un antagonista comercial que fue co-cristalizado con el receptor. A su vez, por estudios de nanoscopia de fluorescencia en células que expresan el receptor se pudo evaluar la constante de

asociación del colorante al receptor en el entorno celular. Para evaluar dicha asociación, se desarrollaron dos métodos cuantitativos.

La metodología utilizada en el estudio de CRHR1 es aplicable a cualquier receptor cuya estructura cristalográfica se encuentre disponible. Por otro lado, el estudio de afinidad es extrapolable al análisis de cualquier experimento de doble marcación de nanoscopía basada en la localización de moléculas únicas.

Palabras clave: microscopía, nanoscopía, fluorescencia, ESIPT, 3-hidroxicromonas, aza-BODIPY, CRHR1

Fluorescent probes for protein labeling and localization in super-resolution microscopy

The aim of this thesis was to synthesize and characterize adequate fluorophores for biomolecule labeling and to evaluate their performance in super-resolution fluorescence microscopy techniques. In particular, we studied a family of 3-hydroxychromones, substituted in two key positions with electron donating or electron withdrawing groups. These compounds display fluorescence arising from two different excited state tautomers, interconverted by an excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) reaction. The position of emission maxima of N* (normal excited state) and T* (tautomer excited state) bands and their intensity ratio depend strongly on environment properties. This kind of compounds is frequently used to study structural changes in cellular compartments or any other micro-heterogeneous systems. The understanding of their dual emission origin, as well as the evaluation of their spectral shift magnitudes and the relationship between their characteristic decay times and chemical structures have become of special interest. In this thesis, we characterized the dependence of N* and T* position, relative intensity and dynamics of emission bands with solvent properties and temperature. We also used computational calculations and photophysical characterization results to shed light on the influence of the electron donating or withdrawing groups in the key positions studied. Based on time resolved experiments performed at different temperatures, we determined the mechanism for T* and N* formation and calculated the rate constants involved, ranging from 10 picoseconds to few nanoseconds.

In this thesis, we also developed an aza-BODIPY dye, ABP-09, to act as a fluorescent antagonist for the type I corticotrophin releasing hormone receptor (CRHR1), a class B GPCR. We proposed this compound after performing docking studies that predicted a favorable interaction with the receptor. The synthesized compound showed adequate properties for super-resolution microscopy, due to its photophysical and photochemical stability, high fluorescence quantum yield and capability to attain dark states. In the super-resolution technique Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM), this compound's performance was similar to that of the most used fluorophores. Experiments in hippocampal cells confirmed that ABP-09 has an antagonist activity for CRHR1 comparable to that of CP-376395, a commercial antagonist co-crystallized with the receptor. STORM images obtained in cells expressing CRHR1 also demonstrated the chemical affinity between ABP-09 and the receptor. Two quantitative methods were developed to calculate the affinity constant involved.

The methodology used in the study of CRHR1 can be used with any receptor whose crystallographic structure is available. Furthermore, the routine developed to calculate molecular affinities can be applied to any double-labeling nanoscopy experiment based on single molecule localizations.

Keywords: microscopy, nanoscopy, fluorescence, ESIPT, 3-hydroxychromones, aza-BODIPY, CRHR1

A la Viei.

Índice

1. Introducción	1
1. Microscopía de fluorescencia	1
1.1. Principios e instrumentación	1
1.1.1. Fluorescencia	1
1.1.2. Generación de imágenes y límite de resolución.....	3
1.1.3. Microscopía de campo amplio y microscopía confocal	6
1.1.4. Iluminación por reflexión total interna (TIRF)	9
1.1.5. Importancia de las marcas	10
1.2. Detección de moléculas individuales.....	11
1.2.1. Localización de moléculas individuales en dos dimensiones	12
1.2.2. Evidencias de la presencia de moléculas únicas.....	14
1.3. Otras técnicas y aplicaciones de microscopía de fluorescencia de molécula única	14
2. Superación del límite de difracción: nanoscopías de fluorescencia	15
2.1. Principios básicos	15
2.2. Técnicas de súper-resolución por localización estocástica (STORM)	16
2.3. Otras técnicas.....	18
3. Aplicaciones	19
3.1. Estudio de compuestos con emisión dual.....	20
3.2. Localización del receptor de la hormona liberadora de corticotropina de tipo 1 (CRHR1) a través de un antagonista fluorescente	22
3.2.1. Relevancia del estudio de CRHR1	22
3.2.2. aza-BODIPYs.....	25
 2. Materiales y métodos.....	29
1. Espectroscopía	29
1.1. Absorción	29
1.2. Emisión y excitación estacionaria	29
1.3. Anisotropía de fluorescencia	30
1.4. Emisión resuelta en el tiempo	32

2. Nanoscopía de fluorescencia: STORM.....	34
2.1. Dispositivo experimental.....	34
2.2. Calibración para imágenes de dos colores	38
2.3. Limpieza de cubreobjetos.....	39
2.4. Análisis de imágenes	40
2.5. Condiciones experimentales	41
3. Síntesis y caracterización de compuestos	43
3.1. Solventes y reactivos	43
3.2. Síntesis de compuestos 1, 2, 2a, 3 y ABP-09	43
3.3. Espectroscopía RMN.....	46
3.4. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa	46
4. Experimentos en células	46
4.1. Líneas celulares.....	47
4.2. Visualización de la incorporación de ABP-09 en células vivas.....	48
4.3. Medición de cAMP generado por activación de CRHR1 a través de biosensor de FRET	49
4.4. Medición de la activación de ERK1/2 y Akt a través de <i>Western blot</i>	51
4.5. Inmunomarcación de CRHR1 y marcación con ABP-09. Preparación de muestras para STORM.	53
5. Métodos computacionales	53
5.1. Cálculos mecano-cuánticos de derivados de 3-hidroxicromona	53
5.2. Estudios de <i>docking</i>	54
3. Dinámica del proceso ESIPT en derivados de 3-HC en función de la temperatura y su patrón de sustitución	55
1. Introducción	55
2. Resultados y discusión.....	59
2.1. Emisión estacionaria.....	59
2.1.1. Influencia del solvente	61
2.1.2. Influencia de la temperatura.....	63
2.1.3. Anisotropía de fluorescencia.....	65
2.2. Cálculos mecano-cuánticos	66
2.3. Fluorescencia resuelta en el tiempo	68
2.4. Discusión.....	71

3. Conclusiones y perspectivas	75
4. Síntesis de un antagonista fluorescente para el estudio de CRHR1 por microscopía y nanoscopía de fluorescencia	77
1. Introducción.....	77
2. Resultados y discusión	79
2.1. Selección de aza-BODIPYs	79
2.2. Síntesis y caracterización de los compuestos de la ruta sintética	81
2.3. Caracterización fotoquímica y fotofísica de ABP-09.....	87
2.4. Estudio del efecto como antagonista de ABP-09 en línea celular HT22-CRHR1.....	92
2.5. Microscopía de súper-resolución: desempeño de ABP-09 en STORM y determinación de su afinidad por CRHR1.....	96
2.5.1. Desempeño de ABP-09 en microscopía de súper-resolución	96
2.5.2. Determinación de afinidad entre ABP-09 y CRHR1	99
2.5.2.1. Determinación de la constante de equilibrio de afinidad a nivel de célula individual	99
2.5.2.2. Análisis de afinidad a través de la distribución de primeros vecinos	106
3. Conclusiones y perspectivas	111
5. Conclusiones y perspectivas generales	115
Bibliografía	119
Apéndice I: Espectroscopía de RMN, espectrometría de masa y cromatografía líquida	i
Apéndice II: Ejemplos de deconvolución espectral de 3-HC	ix
Apéndice III: Códigos de <i>Matlab</i> utilizados para el conteo de pares <i>ij</i> y para simular distribuciones en 2D de moléculas de tipo A y tipo B	xi
Apéndice IV: Funciones de distribución de primeros vecinos.....	xxi
Agradecimientos	xxix

Capítulo 1: Introducción

1. Microscopía de fluorescencia

1.1. Principios e instrumentación

La transparencia óptica de las células y el carácter no invasivo de la luz visible han situado a la microscopia óptica como una de las principales herramientas para el estudio de sistemas vivos. A su vez, la posibilidad de marcar específicamente componentes celulares con fluoróforos, sumada al extremadamente bajo límite de detección de la emisión de luz, permitió que la microscopia de fluorescencia se convirtiera en una de las técnicas más ampliamente utilizadas para visualizar la vida a nivel celular y sub-celular.

El crecimiento exponencial que adquirió esta técnica con el advenimiento de las microscopías de súper-resolución, también conocidas como nanoscopías, dio lugar a la comprensión de diversos fenómenos que no podían observarse previamente debido al límite de resolución impuesto por la difracción de la luz visible en la microscopía de fluorescencia convencional (≈ 250 nm). En esta sección se introducirán algunos principios básicos sobre fluorescencia y microscopía óptica, para posteriormente arribar a la descripción de las nanoscopías desarrolladas a partir de mediados de la década de 1990.

1.1.1. Fluorescencia

La emisión de fluorescencia es un fenómeno ampliamente conocido¹, y en este inciso nos limitaremos a describir el proceso únicamente en forma esquemática. En la Figura 1.1 se presenta un Diagrama de Jablonski, en el cual se resumen las distintas transiciones que puede experimentar una molécula luego de absorber un fotón de una energía determinada. Este primer paso, cuya velocidad se representa con I_A (intensidad absorbida), implica una transición electrónica desde el estado fundamental (S_0) hacia uno excitado (S_1 , en este caso). La energía del fotón absorbido coincide exactamente con la diferencia de energía entre ambos estados.

Una vez generado el estado excitado inicial, conocido como estado Franck-Condon de absorción, se produce una relajación vibracional en 10^{-12} s hacia el estado vibracional fundamental de S_1 . A partir de ese momento, la molécula puede sufrir distintos procesos, entre los cuales se encuentra la emisión de fluorescencia. La misma consiste en la relajación hasta un estado vibracional excitado de S_0 (estado Franck-Condon de emisión) en $10^{-8} - 10^{-9}$ s, acompañado por la emisión de un fotón. En el esquema la constante de velocidad del proceso radiativo se representa con k_f . Finalmente, la molécula sufre una relajación vibracional para volver al estado vibracional

fundamental en el estado electrónico fundamental. Teniendo en cuenta la energía de los estados Franck-Condon y la de los estados vibracionales fundamentales de S_0 y S_1 , se puede ver que la energía del fotón absorbido es mayor que la del emitido. Esta diferencia energética da lugar a espectros de emisión desplazados a longitudes de onda mayores respecto de los de absorción, conociéndose la diferencia entre los máximos de ambos espectros como Corrimiento de Stokes.

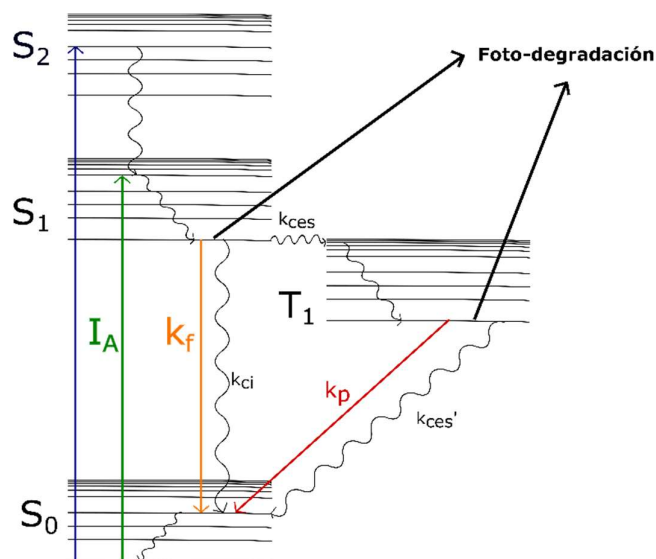


Figura 1.1. Diagrama de Jablonski. En flechas sólidas y coloreadas se presentan los procesos que involucran la absorción o emisión de fotones. Las líneas curvas representan procesos no radiativos, mientras que la flecha sólida negra muestra la reacción de foto-degradación. Las k_i representan las constantes de velocidad de cada proceso unimolecular.

Si bien los procesos de absorción y emisión recién descritos son los de mayor relevancia para la microscopía de fluorescencia convencional, también se pueden producir otros fenómenos fotofísicos y fotoquímicos. Entre los que compiten con la fluorescencia se encuentran la conversión interna, representada por k_{ci} en el diagrama, y el cruce entre sistemas (k_{ces}), que involucra una transición hacia el estado triplete fundamental (ambos procesos son no radiativos). También existe la posibilidad de que la molécula sufra foto-degradación de forma irreversible o una transformación química desde algún estado excitado.

Un parámetro de relevancia para un fluoróforo es el tiempo de vida de fluorescencia. Si se analiza la desaparición de S_1 en su estado vibracional fundamental por los procesos unimoleculares descritos en la Figura 1.1, se arriba a que S_1 decae en forma mono-exponencial con un tiempo característico $\tau_f = \frac{1}{k_f + k_{nr}}$, donde k_{nr} representa la suma de las constantes no radiativas (en este caso k_{ic} y k_{ces}). Este tiempo se conoce como tiempo de vida de fluorescencia, ya que su determinación experimental se lleva a cabo midiendo el tiempo en el que decae la emisión fluorescente.

Otro parámetro de interés es el rendimiento cuántico de fluorescencia. En términos generales, se puede definir el rendimiento cuántico del proceso “i” generado luego de la absorción de un fotón según:

$$\Phi_i = \frac{\# \text{ moléculas que experimentan el proceso } i}{\# \text{ fotones absorbidos}} = \frac{v_i}{I_A}$$

donde v_i representa la velocidad del proceso “i”. En particular, a partir del diagrama de la Figura 1.1 se puede arribar a la siguiente expresión para el rendimiento cuántico de fluorescencia:

$$\Phi_f = \frac{\# \text{ moléculas que emiten fluorescencia}}{\# \text{ fotones absorbidos}} = \frac{v_f}{I_A} = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} = k_f \tau_f$$

El brillo de un fluoróforo se define como la cantidad de fotones emitidos por la molécula por unidad de tiempo. Se puede ver que el mismo depende tanto de la probabilidad del fluoróforo de absorber luz y excitarse, como de la proporción de moléculas excitadas que emiten fluorescencia. El primer factor está directamente relacionado con el coeficiente de absorción molar (ϵ), mientras que el segundo no es más que el rendimiento cuántico de fluorescencia. Por lo tanto, el brillo se puede definir como el producto de ambas propiedades: $B = \Phi_f \epsilon$. Teniendo en cuenta que en microscopía de fluorescencia el contraste depende de la detección de fotones emitidos, es deseable que los fluoróforos posean el mayor brillo posible, y eso se logra con un elevado coeficiente de absorción molar (a la longitud de onda de excitación del experimento) y un alto rendimiento cuántico de fluorescencia.

1.1.2. Generación de imágenes y límite de resolución

En microscopía de campo lejano las imágenes se generan mediante el uso de lentes. En la Figura 1.2 se presenta el funcionamiento básico de un microscopio moderno de campo amplio, que cuenta con dos lentes para la formación de la imagen. El objeto o espécimen se coloca en el plano focal (f_o) de una de ellas, que se denomina objetivo (O) y se encuentra corregida a infinito. Utilizando óptica geométrica, se puede ver que los rayos provenientes del objeto salen colimados luego de pasar por el objetivo. Una segunda lente, llamada lente de proyección (LP), cumple la función de refractar los rayos paralelos que arriban a la misma, enfocándolos a una distancia correspondiente al foco de la lente, f_p' , generando de este modo la imagen.

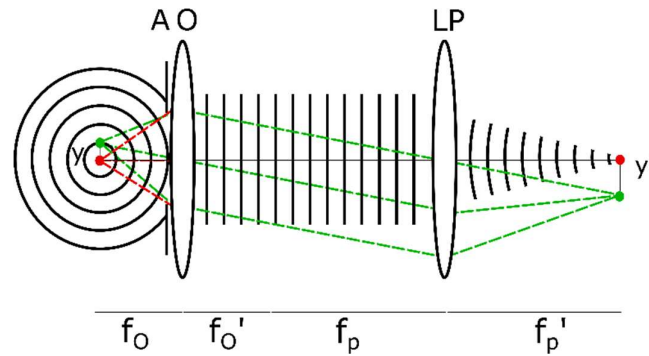


Figura 1.2. Representación esquemática de un microscopio óptico. A representa la apertura de la lente objetivo; O la lente objetivo; LP lente de proyección; f_o y f_p distancias focales del objetivo y de la lente de proyección. y es la altura del objeto e y' la altura de la imagen proyectada.

La magnificación obtenida es igual a la relación entre las distancias focales de ambas lentes:

$$M = \frac{f_p}{f_o}$$

Generalmente, la lente de proyección se encuentra fija dentro del microscopio y la selección del objetivo determina la magnificación obtenida, cuyo valor se suele hallar entre 10 y 100. Una ventaja de utilizar microscopios corregidos a infinito es que, al contar solamente con rayos paralelos entre la lente objetivo y la de proyección, es posible insertar en el camino diversos elementos ópticos sin que eso implique un cambio en la dirección de los rayos. A su vez, la lente de proyección puede incluir correcciones de aberraciones que puedan encontrarse en el microscopio.

Una característica relevante del objetivo es la apertura numérica. La misma se encuentra relacionada con el ángulo máximo de colección de luz proveniente del foco de la lente. En la Figura 1.3 se presenta el objetivo y el ángulo máximo de recolección, α . La apertura numérica (AN) se vincula con α según la siguiente expresión, donde n representa el índice de refracción del medio entre el objetivo y el objeto:

$$AN = n \cdot \sin(\alpha)$$

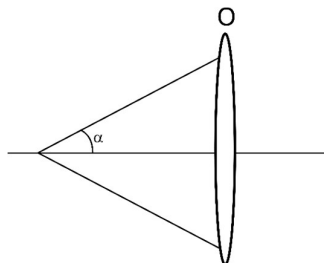


Figura 1.3. Representación del ángulo máximo de colección de luz proveniente del foco del objetivo.

Hasta aquí solamente hemos utilizado la óptica geométrica para describir el comportamiento de la luz y su interacción con las lentes presentes en un microscopio. Sin embargo, cuando los objetos son de dimensiones comparables a la longitud de onda de la luz utilizada, la naturaleza ondulatoria de la luz toma relevancia y debe ser tomada en cuenta ya que se producen fenómenos de difracción. Ernst Abbe estudió rigurosamente estos fenómenos y demostró que la difracción impone a la microscopía óptica un límite para su resolución².

En particular, si un haz de luz incide sobre un objeto puntual dispuesto en el foco de un objetivo, la misma difracta la luz como una onda esférica, w_o . Solamente una fracción de esta onda esférica puede ser colectada por la lente y transformarse en un frente de ondas paralela (w_i), debido a la limitación impuesta por la AN del objetivo. De este modo, hay información correspondiente a patrones de difracción superiores que no son colectados y se pierde en este proceso. Como resultado, la reconstrucción de la imagen luego de atravesar la lente de proyección contiene menos información que la que posee el objeto, y por lo tanto no es posible realizar una reconstrucción completa del mismo. Debido a esta imposibilidad, una fuente de luz puntual no puede enfocarse en un nuevo punto mediante el uso de lentes, sino que se obtiene un patrón de difracción de tamaño finito conocido como disco de Airy, tal como se puede ver en la Figura 1.4. El patrón de intensidades generado en la imagen se conoce como “Función de Dispersión de Punto”, o PSF (por sus siglas en inglés, *Point Spread Function*). La misma posee su máximo valor en la posición correspondiente al objeto puntual y decae radialmente hasta una intensidad igual a cero con una funcionalidad que puede aproximarse por una función gaussiana en dos dimensiones. Luego del primer mínimo, en que la intensidad llega a cero y hacia distancias radiales mayores, vuelven a presentarse máximos de intensidad, aunque los mismos son significativamente menores al máximo situado en el centro del disco.

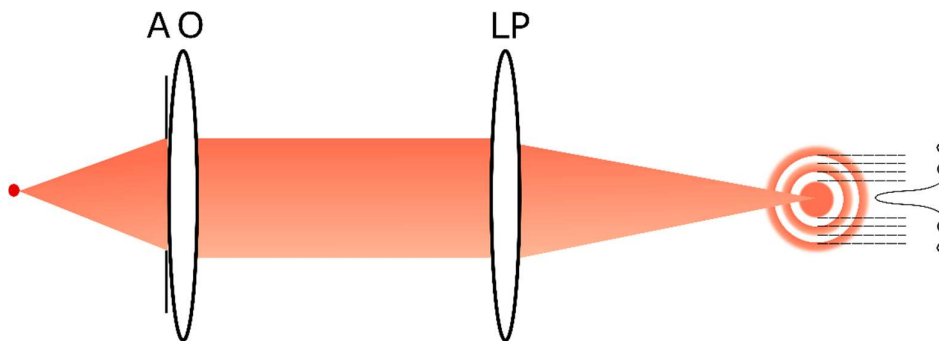


Figura 1.4. Representación del patrón de difracción obtenido al enfocar una fuente puntual de luz con lentes.

La forma del disco de Airy de la Figura 1.4 corresponde a un sistema sin aberraciones. En caso de trabajar con un microscopio que presenta astigmatismo, por ejemplo, el patrón posee una

forma elipsoide. A su vez, el radio en el cual la intensidad decae al primer mínimo depende de la AN del objetivo y de la longitud de onda utilizada. Así, cada microscopio cuenta con su propia PSF y es muy importante conocerla, ya que la calidad de las imágenes obtenidas depende en gran medida de la misma.

La resolución de un microscopio está estrechamente relacionada con su PSF. Al obtenerse un patrón de Airy como imagen de una fuente puntual, dos puntos que se encuentren muy cercanos entre sí tendrán una superposición apreciable de sus PSF y no serán distinguibles. En la Figura 1.5 se muestra cómo evoluciona la superposición de imágenes de dos fuentes puntuales a medida que la distancia entre ellos se acorta. Se puede ver que en el tercer caso los puntos son indistinguibles. El límite de resolución establecido por Abbe² indica que dos objetos podrán distinguirse si se encuentran a una distancia d mayor que $\frac{\lambda}{2.n.\text{sen}(\alpha)}$, lo que también puede escribirse de la siguiente manera:

$$d = \frac{\lambda}{2.AN}$$

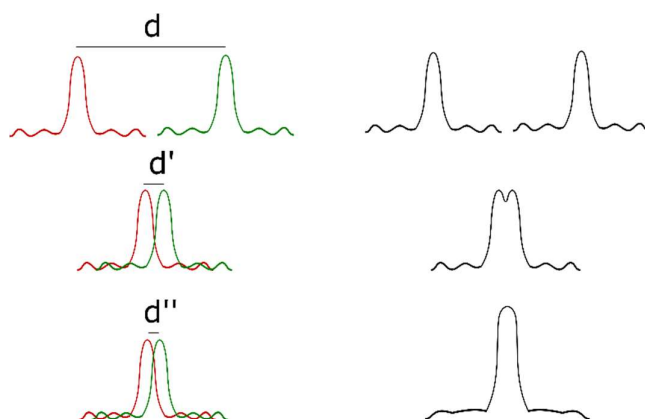


Figura 1.5. Imagen obtenida al enfocar dos objetos puntuales a distancias variables (d , d' y d''). A la izquierda se muestran los patrones de difracción en forma separada y a la derecha la suma de los mismos.

Esta distancia es equivalente al radio del disco de Airy y puede aproximarse por el ancho a media altura de la función gaussiana que mejor ajusta la PSF. Considerando valores de λ y AN típicos en microscopía de fluorescencia (500 nm y 1, respectivamente), el límite de resolución se encuentra cercano a 250 nm.

1.1.3. Microscopía de campo amplio y microscopía confocal

En la actualidad existen distintos tipos de microscopios de fluorescencia. Los llamados de epi-fluorescencia son aquellos en los cuales una única lente (el objetivo) se utiliza tanto para

iluminar la muestra como para colectar los fotones emitidos por la misma. Entre estos microscopios, se destacan los llamados de campo amplio y los confocales.

En la Figura 1.6 se presentan en forma esquemática los componentes de un microscopio de campo amplio. En primer lugar, se cuenta con una fuente de excitación, siendo las más utilizadas las lámparas de vapor de mercurio, las de haluros metálicos, los diodos emisores de luz (LEDs, por sus siglas en inglés) y los láseres. La función de la lente L1 es enfocar el haz proveniente de la fuente en el primer plano focal del objetivo, abreviado en la figura como BFP (por sus siglas en inglés, *Back Focal Plane*). Antes de arribar al BFP, la luz proveniente de la fuente atraviesa un filtro de excitación que cumple la función de transmitir únicamente las longitudes de onda de interés para excitar la muestra. El recuadro punteado representa el cubo de fluorescencia, donde se introduce un espejo dicroico que debe reflejar la luz de excitación y dirigirla hacia la muestra, y transmitir la luz de emisión proveniente de la misma en su camino hacia el sistema de detección. Al enfocarse en el BFP del objetivo, la luz de excitación llega colimada a la muestra y excita un área equivalente a la del haz incidente. Posteriormente, la luz emitida desde la muestra atraviesa el objetivo y, luego de transmitirse a través del espejo dicroico, pasa por un filtro de emisión que limita el intervalo espectral que llega al detector. En caso de utilizar un láser de alta potencia, también se utilizan filtros eliminadores de banda (conocidos como filtros *notch*) que terminan de reflejar la fracción de luz proveniente del láser. Finalmente, una lente de proyección enfoca la emisión de la muestra en un detector para obtener la imagen magnificada. Los detectores más utilizados las cámaras CCD (por sus siglas en inglés: *Charge-coupled devices*), EM-CCD (EM: *Electron multiplied*) y CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductors*).

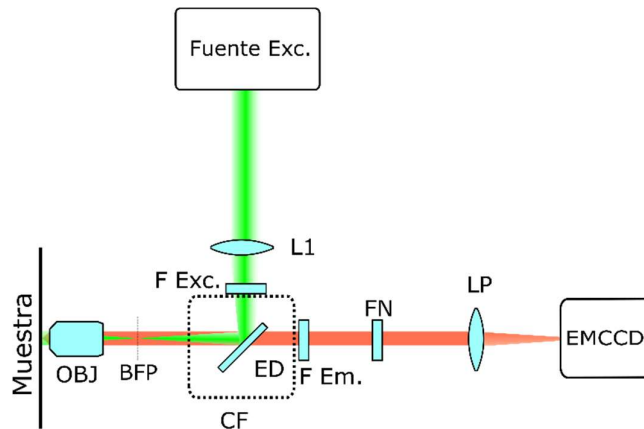


Figura 1.6. Esquema básico de un microscopio de epi-fluorescencia de campo amplio. L1 es una lente que enfoca la luz de excitación en el primer plano focal del objetivo. Los filtros de excitación y de emisión limitan, respectivamente, las frecuencias que arriban a la muestra y al detector (EMCCD). OBJ es el objetivo del microscopio, LP la lente de proyección y ED un espejo dicroico. FN es un filtro *notch*. CF es el cubo de fluorescencia que contiene tanto los filtros de excitación y de emisión como el ED.

En este tipo de microscopios se excitan de manera simultánea numerosos fluoróforos distribuidos espacialmente en el área de excitación del haz colimado, tal como se muestra en la Figura 1.7. Si bien a la cámara llega preferentemente la emisión de aquellas moléculas dispuestas en el plano focal del objetivo, la fluorescencia proveniente del resto de la muestra también lo hace, aportando una señal de fondo apreciable e impidiendo a su vez obtener una buena resolución axial.

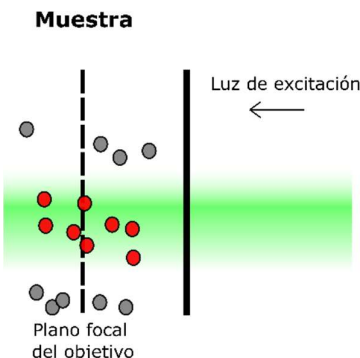


Figura 1.7. Diagrama que muestra la excitación de fluoróforos (círculos rojos) en el área iluminada por el haz colimado en un microscopio de campo amplio. Aquellas moléculas que se encuentran fuera de dicha área (círculos grises) no se excitan y por lo tanto tampoco emiten.

En microscopía confocal la fuente de excitación es siempre un láser y el mismo llega enfocado a la muestra. En la Figura 1.8 se presenta en forma esquemática la disposición de componentes en un microscopio confocal. En este tipo de microscopios se elimina la fluorescencia que se encuentra fuera de foco a través de un *pinhole*, que consiste en una pequeña abertura dispuesta entre el detector y la lente de proyección y permite el paso altamente selectivo de la luz proveniente del plano focal del objetivo. Como detector se utiliza un fotodiodo de avalancha (APD, *Avalanche Photodiode*) y para obtener una imagen se debe realizar un barrido, que puede llevarse a cabo por movimiento de la muestra, con una platina motorizada, o bien por el uso de espejos galvanométricos que muevan el haz sobre la muestra. Así, la microscopía confocal presenta una resolución axial superior a la microscopía de campo amplio, pudiendo realizar imágenes tridimensionales por superposición de cuadros obtenidos al enfocar el láser a distintas profundidades.

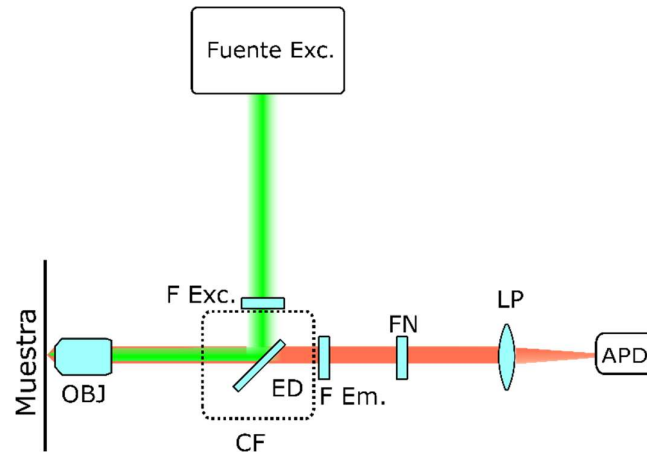


Figura 1.8. Esquema básico de un microscopio confocal. A diferencia del de campo amplio, el láser se enfoca sobre la muestra. En este caso, se presenta un APD de pequeñas dimensiones (20-100 μm) como detector, que cumple a la vez el papel de *pinhole*.

1.1.4. Iluminación por reflexión total interna (TIRF)

Una forma de evitar la señal de fondo en microscopía de campo amplio consiste en irradiar la muestra con cierto ángulo de incidencia θ mayor al ángulo crítico θ_c sobre la superficie que separa al cubreobjetos de la muestra, de modo tal de obtener reflexión total del haz de excitación. El valor de θ_c puede calcularse a través de la ley de Snell, suponiendo el ángulo refractado igual a 90° . Cuando este fenómeno tiene lugar, el haz incidente se refleja por completo, pero a su vez genera un campo electromagnético del lado de la muestra que se encuentra confinado espacialmente a las cercanías de la interfase vidrio (cubreobjetos)-muestra, tal como se puede ver en la Figura 1.9. Este campo, conocido como campo evanescente, decae exponencialmente hacia el interior de la muestra y en aproximadamente 200 nm su intensidad se vuelve despreciable cuando se usa luz visible para la irradiación. De este modo, es posible limitar la excitación exclusivamente a los fluoróforos que se encuentran cerca de la superficie reduciendo apreciablemente la señal de fondo. Este tipo de iluminación resulta de gran utilidad cuando se quiere observar la membrana plasmática de una célula³, ya que los fluoróforos de interés se encuentran cercanos a la superficie. El nombre que recibe la técnica que utiliza esta iluminación es TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*).

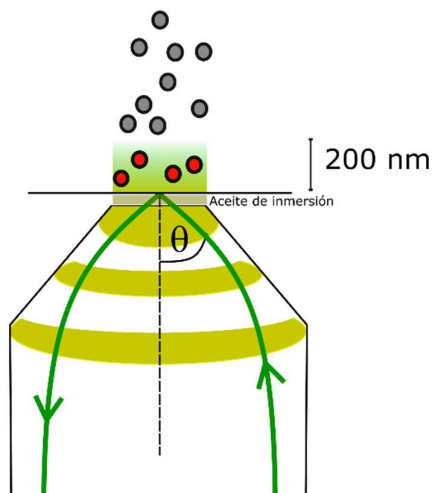


Figura 1.9. Representación de un microscopio de campo amplio funcionando con iluminación de tipo TIRF.

Al irradiar con ángulos elevados, la microscopía con iluminación TIRF requiere trabajar con aceites de inmersión entre el objetivo y el cubreobjetos, y que los mismos posean índices de refracción similares al del vidrio con el fin de evitar refracciones al llegar al cubreobjetos.

Existen otras microscopías que brindan mejoras en la resolución espacial. Entre ellas se encuentran las microscopías de dos fotones⁴, $4\pi^5$ y de iluminación estructurada⁶. Todas representaron grandes avances desde distintos puntos de vista, aunque ninguna logró sobrepasar los 100 nm de resolución.

1.1.5. Importancia de las marcas

Las sondas fluorescentes son una pieza fundamental en todas las microscopías de fluorescencia. En la Figura 1.10 se presenta un esquema tomado del trabajo de Jares-Erijman y Jovin donde se presentan los distintos tipos de sondas fluorescentes utilizadas con mayor frecuencia⁷. Allí pueden encontrarse fluoróforos orgánicos, *quantum-dots*, proteínas fluorescentes y anticuerpos que pueden marcarse con fluoróforos para ser visualizados. Cada sonda presenta ventajas y desventajas en su uso, y la selección de la misma se debe adecuar a las necesidades de cada experimento. Como una generalidad, es deseable que las sondas utilizadas tengan las siguientes características: un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia y coeficiente de absorción molar; una alta fotoestabilidad; máximos de absorción y emisión lo más al rojo posible, con el objetivo de minimizar la autofluorescencia; un corrimiento de Stokes tal que permita separar la emisión de la luz dispersa proveniente del haz de excitación a través de filtros; ser soluble en el medio donde se utilice; entre otras.

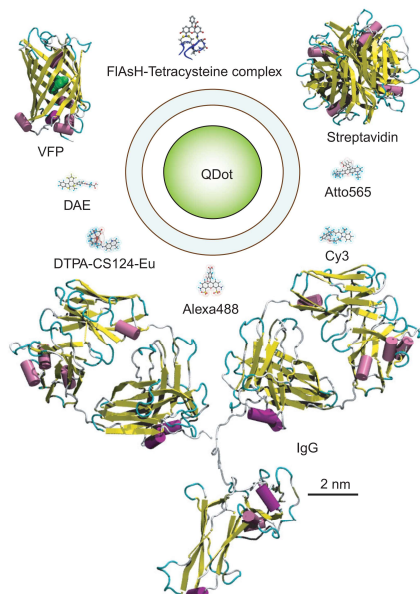


Figura 1.10. Representación a escala de distintos tipos de sondas fluorescentes. La barra negra indica 2 nm (reproducido de Jares-Erijman y Jovin⁷).

Como veremos en las siguientes secciones, las sondas fluorescentes jugaron un rol clave en el desarrollo de las microscopías de súper-resolución.

1.2. Detección de moléculas individuales

El desarrollo de láseres de alta potencia y detectores ultra sensibles dio lugar a la detección de moléculas individuales en microscopía y espectroscopía de fluorescencia, representando un avance fundamental en la sensibilidad de ambas técnicas. A su vez, la detección de fluoróforos individuales permitió empezar a explorar sus entornos moleculares y caracterizar la presencia de sub-poblaciones con comportamientos particulares. El estudio de un ensamble de moléculas, como el que tiene lugar en la espectroscopía o microscopía de fluorescencia convencional, esconde esta heterogeneidad detrás de un comportamiento promedio. Por otro lado, el estudio de procesos a nivel de molécula individual no requiere la sincronización del mismo a través de un estímulo o evento, como sí ocurre en los estudios a nivel de ensamble⁸.

Hacia principios de los años 90, distintos grupos de investigación empezaron a trabajar con detección de moléculas individuales a través de su fluorescencia. En particular, Orrit informó por primera vez en 1990 la detección de una molécula por emisión fluorescente en un cristal⁹. En 1993 Eric Betzig detectó fluoróforos inmovilizados con microscopía de campo cercano¹⁰, mientras que pocos años después Macklin obtuvo imágenes de moléculas individuales en un microscopio de fluorescencia confocal¹¹. Con el advenimiento de las cámaras EM-CCD también se multiplicaron los estudios de moléculas individuales utilizando microscopía de campo amplio y con iluminación TIRF^{12–15}. Tanto el estudio espectroscópico de los fluoróforos como la visualización de procesos

biológicos empezaron a revelar nuevas propiedades gracias a la detección de moléculas únicas. A su vez, el cruzamiento entre disciplinas como la química orgánica, físico-química, física y biología se vio fuertemente potenciado.

En la Figura 1.11 se muestra el crecimiento exponencial en las publicaciones halladas en PUBMED con palabra clave “*single-molecule fluorescence*” entre 1989 y 2008 (la imagen está adaptada de la Figura 1 del trabajo de Joo¹⁶). Como veremos más adelante, la detección de moléculas individuales fue también un elemento clave en el desarrollo de las nanoscopías de fluorescencia.

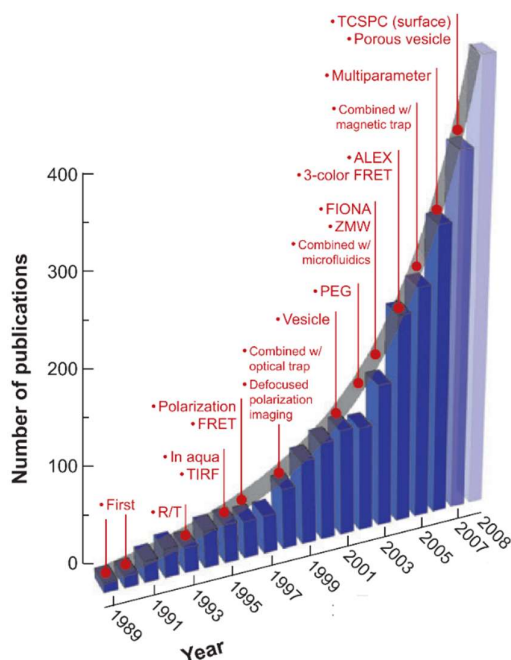


Figura 1.11. Crecimiento exponencial de publicaciones relacionadas a fluorescencia de moléculas individuales. En rojo se resaltan los avances técnicos. Figura adaptada del trabajo de Joo¹⁶.

1.2.1. Localización de moléculas individuales en dos dimensiones

Los estudios realizados a nivel de molécula individual sin el uso de técnicas de super-resolución deben necesariamente llevarse a cabo sobre muestras donde los fluoróforos se encuentren esparcidos, de modo tal de minimizar la probabilidad de encontrar dos de ellos en una misma región de las dimensiones de la PSF del microscopio. Solamente así se puede aseverar que la fluorescencia detectada proviene de una única fuente emisora. La estrategia para lograr esta densidad, que debe ser $<1 \text{ moléc}/\mu\text{m}^2$, depende del tipo de muestra a preparar. Cuando se trata de una proteína fluorescente se debe regular su expresión, mientras que si se trata de un fluoróforo embebido en un polímero se debe preparar una solución del orden de 10^{-10} - 10^{-11} M previa a la eliminación de solvente¹⁷.

Thompson estudió en 2002 la dependencia de la precisión de localización con distintos parámetros cuando se realiza un ajuste gaussiano sobre la PSF obtenida a partir de fluoróforos individuales detectados por una cámara¹⁸. Su resultado final se resume en la Ecuación 1.1:

$$\sigma_{\mu_i} = \sqrt{\frac{S_i^2}{N} + \frac{a^2/12}{N} + \frac{8\pi S_i^2 b^2}{a^2 N^2}} \quad [1.1]$$

donde σ_{μ_i} es la precisión en la localización de la posición en i ($i=x$ o y), S_i es el desvío estándar de la gaussiana en dirección i , N es el número de fotones colectados, a el tamaño de píxel de la cámara y b el desvío estándar de la señal de fondo, incluyendo el ruido del detector y el de la señal de fluorescencia. El primer término representa el ruido proveniente de los fotones emitidos por el fluoróforo, el segundo contempla el tamaño finito de píxel (un tamaño ideal debe poder muestrear la gaussiana con al menos 3 píxeles) y el tercero representa el efecto de la señal de fondo generada por diversos motivos (cuentas oscuras, elementos fluorescentes distintos a la muestra como las partículas de polvo, autofluorescencia del sistema, etc.).

Teniendo en cuenta la Ecuación 1.1, se puede ver que la precisión en la localización del centro de la fuente emisora puede llegar a ser muy alta. En particular, si el fluoróforo otorga un número elevado de fotones y a su vez señal de fondo es baja, σ_{μ_i} puede llegar a valer unos pocos nanómetros, a pesar de que la imagen tenga un tamaño de 250 nm. En la Figura 1.12 se puede visualizar el efecto neto del número de fotones sobre la nitidez del patrón gaussiano formado a partir de un *bead* fluorescente (la figura pertenece al trabajo de Thompson¹⁸). Allí puede verse con claridad que un mayor número de fotones recolectados da lugar a un patrón de intensidades de mayor nitidez, que ajustará mejor a la función gaussiana y por lo tanto tiene mejor precisión de localización.

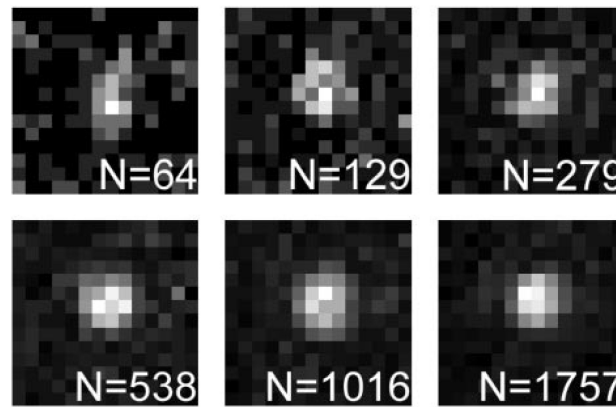


Figura 1.12. Imágenes de un *bead* fluorescente obtenidas con un número creciente de fotones por acumulación de 2, 4, 8, 16 o 32 cuadros. Figura tomada del trabajo de Thompson¹⁸.

El análisis de fuentes emisoras puntuales realizado por Thompson fue tomado en adelante por la gran mayoría de los grupos de investigación que trabajan en fluorescencia de moléculas únicas. En particular, Yildiz lo utilizó en 2003 para estudiar los pasos de miosina V marcada con el fluoróforo Cy3, obteniendo una precisión de localización menor a 1,5 nm a través de una técnica que denominó FIONA (*Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy*)¹⁹.

1.2.2. Evidencias de la presencia de moléculas únicas

La posibilidad de seguir la traza temporal de la intensidad de fluorescencia en moléculas inmovilizadas permite detectar la foto-degradación que todas ellas experimentan al ser excitadas en forma continua. Si la fluorescencia observada corresponde a una única molécula, la traza temporal debe consistir en una fluctuación alrededor de un valor promedio hasta el momento de la foto-degradación. En este punto la intensidad cae en un único escalón hasta el valor de la señal de fondo.

En caso de contar con dos moléculas dispuestas a menos de 200 nm este fenómeno no se observa, sino que se tiene un foto-blanqueo en dos etapas. Gordon utilizó esta degradación en dos pasos para poder localizar ambas moléculas, realizando un ajuste gaussiano a la que sobrevive mayor tiempo una vez que la misma se encuentra sola y posteriormente restando esa función al patrón correspondiente a las dos moléculas superpuestas²⁰. De este modo, logró localizar moléculas a 10 nm de distancia con una precisión de 5 nm. Ulbrich utilizó la foto-degradación en pasos para contar la cantidad de subunidades presentes en una proteína de membrana²¹.

Otro comportamiento típico de la medida fluoróforos individuales es el parpadeo o *blinking*. El mismo consiste en un encendido y apagado reiterado de la molécula que se debe a transiciones hacia estados no fluorescentes, como pueden ser estados tripletes, radicalarios o confórmeros que no emiten, y la posterior vuelta a S_0 desde donde se puede excitar y emitir fluorescencia nuevamente^{17,22–24}. En algunos casos, este fenómeno puede modularse por luz de determinada longitud de onda y, como veremos más adelante, resulta de gran importancia para las nanoscopías de fluorescencia.

1.3. Otras técnicas y aplicaciones de microscopía de fluorescencia de molécula única

Hasta aquí hemos profundizado en la detección y localización de moléculas individuales en condiciones de inmovilidad, ya que son las que utilizaremos en el contexto de este trabajo de tesis. Sin embargo, el abanico de técnicas y aplicaciones desarrolladas en las últimas décadas en torno a este tipo de microscopía es más amplio. A continuación, presentaremos brevemente algunas de ellas.

La transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) es un mecanismo ampliamente conocido²⁵. La misma ocurre por la interacción dipolar entre un dador en estado excitado (S_1) y un aceptor en estado fundamental (S_0), debiendo cumplirse un solapamiento entre los espectros de emisión del dador y de absorción del aceptor, así como también determinados requisitos de orientación molecular. Por otro lado, es un fenómeno fuertemente dependiente de la distancia y ocurre en el intervalo de 1-10 nm²⁶. La aplicación de FRET a nivel de moléculas individuales fue introducida por Ha²⁷ en 1996, y a partir de entonces su utilización creció exponencialmente, aplicándose al estudio de distintos procesos biológicos^{7,16,28-30}.

La detección de moléculas individuales también permitió estudiar trayectorias de moléculas, a través de la técnica conocida como *tracking*. En 1996 Schmidt visualizó moléculas únicas de rodamina difundiéndose en una membrana lipídica con resolución temporal de 5 ms y una precisión de localización de 30 nm en cada cuadro³¹. En años posteriores se publicaron numerosas aplicaciones de *tracking*, tanto de moléculas únicas como de partículas individuales^{19,32-37}.

Finalmente, una técnica ampliamente utilizada que trabaja con un número bajo de moléculas es la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS, por sus siglas en inglés)³⁸. En general se aplica en combinación con microscopía confocal, utilizando el láser enfocado como un volumen de excitación fijo. El volumen confocal se encuentra en el orden de los femtolitros y las concentraciones de trabajo son aproximadamente 1 nM. A través de fluctuaciones de la intensidad a lo largo del tiempo dentro de dicho volumen se pueden obtener constantes de difusión e información sobre procesos que ocurren a tiempos más cortos que la difusión, como pueden ser la transición a un estado triplete³⁹, una isomerización o la unión de un ligando a una proteína⁴⁰. En particular, FCS analiza la función de autocorrelación temporal para las fluctuaciones de la intensidad de la fluorescencia colectada y a través de su adaptación a distintos modelos, obtiene información molecular de interés.

2. Superación del límite de difracción: nanoscopías de fluorescencia

2.1. Principios básicos

A lo largo de los últimos años han aparecido distintas técnicas de microscopía de súper-resolución como STED^{41,42}, STORM⁴³, RESOLFT⁴⁴, PALM⁴⁵, PAINT⁴⁶ y GSDIM⁴⁷ que han logrado un poder resolutivo de 10-50 nm. Recientemente se ha alcanzado una resolución de 1-5 nm a través de la técnica de MINFLUX, llegando al orden del tamaño molecular⁴⁸. De este modo, las nanoscopías de fluorescencia lograron superar el límite impuesto por la difracción. Por los aportes

realizados en este campo, S. W. Hell, E. Betzig y W. E. Moerner fueron galardonados con el Premio Nobel de Química en 2014.

Todas estas técnicas coinciden en un principio básico, que es la utilización de estados encendidos y apagados de los fluoróforos para alcanzar la resolución sub-difracción⁴⁹. Los primeros consisten en estados emisivos cuya fluorescencia es dirigida hacia el sistema de detección, mientras que los segundos son estados que, o bien no emiten fotones, o si los emiten son evadidos con filtros adecuados. Los estados apagados pueden ser estados tripletes, radicalarios, confórmeros de isomería *cis-trans*, distintos estados conformacionales en proteínas fluorescentes, productos de apertura de anillo, entre otros.

Las nanoscopías se basan en la transición controlada entre ambos tipos de estados, y el modo en que lo logran, sumado al tipo de fluoróforo utilizado y el estado oscuro al que se arriba, determinan generalmente la especificidad de cada técnica. Por todo lo dicho, se puede ver que los fluoróforos han tenido un rol preponderante en el desarrollo de las nanoscopías. Esto se vio acompañado por un gran interés en conocer y controlar las transiciones entre estados brillantes y oscuros, y en la generación de nuevas sondas con mejor desempeño⁵⁰⁻⁵⁴.

A continuación, se explican los principios de la técnica STORM (por *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*), que a su vez son muy similares a los de otras nanoscopías de localización estocástica.

2.2. Técnicas de super-resolución por localización estocástica (STORM)

La nanoscopía de STORM se basa en separar en el dominio del tiempo las localizaciones de las miles o millones de moléculas presentes típicamente en una muestra biológica, que en una imagen de epi-fluorescencia convencional se encontrarían separadas lateralmente una distancia menor al radio de la PSF. La separación temporal de localizaciones se logra manteniendo la gran mayoría de las moléculas en su forma apagada y encendiendo a distintos tiempos y de forma estocástica una proporción muy baja de ellas. De esta manera se logra que en cada cuadro la densidad de fluoróforos encendidos sea baja (menor a 1 molécula/ μm^2). De ese modo, la probabilidad de que dos de ellos se encuentren encendidos en una misma región del tamaño de la PSF es despreciable. Así, es posible localizar las pocas moléculas encendidas y a través de un ajuste gaussiano conocer su posición con una precisión de algunos nanómetros. El resultado de este proceso es la obtención de un punto en el centro de cada localización con una precisión de 10-50 nm donde antes había una PSF de 250 nm originada por la emisión.

En el cuadro subsiguiente, las moléculas que se encontraban encendidas deben pasar a un estado oscuro y algunas otras que estaban apagadas deben encenderse para ser localizadas. Este proceso se realiza reiteradas veces. Normalmente se adquieren secuencias de entre 20.000 y 30.000 cuadros. Finalmente, por superposición de todas las localizaciones se obtiene la imagen de súper-resolución. En el siguiente esquema, adaptado del trabajo de tesis de doctorado Federico M. Barabas⁵⁵, se representa el proceso de adquisición de imágenes (Figura 1.13).

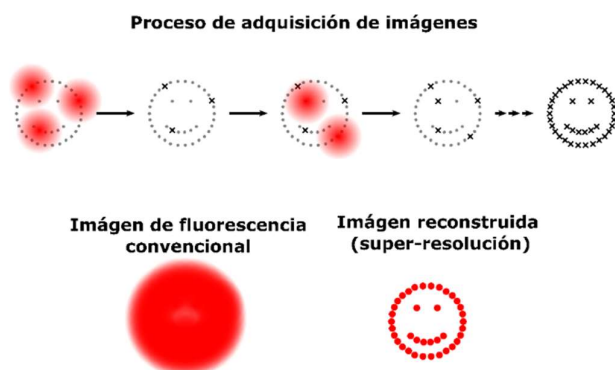


Figura 1.13. Representación de la adquisición de imágenes en STORM. Se presenta el encendido secuencial de pocas moléculas en cada cuadro. La triple flecha indica decenas de miles de reiteraciones. Finalmente se presenta la imagen de fluorescencia convencional junto a la de súper-resolución. Figura adaptada de la tesis de F. Barabas⁵⁵.

La forma en que se logra controlar el encendido y apagado de fluoróforos puede variar según la molécula. A modo de ejemplo, en el trabajo original de STORM se utiliza una diada Cy3-Cy5 que se excita con un láser rojo de baja potencia (30 W/cm^2) para generar la emisión de Cy5, y el mismo láser favorece la posterior transición de Cy5 a un estado oscuro. Un láser verde de baja potencia (1 W/cm^2) es el encargado de recuperar el estado encendido de Cy5 ayudado por Cy3, y de este modo la diada funciona como una llave que permite modular el encendido estocástico con luz verde, y la emisión y re-apagado con luz roja⁴³. Un trabajo publicado poco tiempo después demostró que no era necesario usar una diada, y obtuvo imágenes de STORM con AlexaFluor647 y Cy5 por separado, sin la ayuda de activadores y utilizando el mismo modo de encendido y apagado que en el trabajo de STORM original. Esta técnica recibió el nombre de dSTORM (por *direct* STORM)⁵⁶. La reactivación de ambos compuestos, que son estructuralmente similares, puede hacerse con luz entre 337 y 532 nm⁵⁷. El mecanismo por el cual las cianinas como Cy5 pasan a un estado oscuro en presencia de tioles primarios fue descrito por Dempsey⁵⁸. El mismo consiste en la formación de un aducto entre el tiol y el puente metínico de Cy5 en estado excitado. Esta adición interrumpe la conjugación y convierte a Cy5 en una especie incapaz de absorber la luz de excitación. Finalmente, con luz UV se produce la fotólisis del aducto y la consiguiente vuelta al estado brillante. Por otro lado, la utilización de *buffers* que contienen agentes que remueven el oxígeno como las enzimas glucosa oxidasa y catalasa, así como también desactivadores de estados

tripletes como β -mercaptoetanol, mejoran la eficiencia de fotoconversión de Cy5 o AlexaFluor647.^{50,57,59}

Una tercera técnica que presenta gran similitud con STORM y dSTORM es GSDIM (por *Ground State Depletion and Individual Molecule return*)⁴⁷. En la misma se utilizan potencias elevadas (1 kW/cm^2) de forma tal de que un pequeño porcentaje de las moléculas se encuentren S_0 o S_1 , mientras que el resto habita estados oscuros de tiempos de vida largos como el triplete, o estados alcanzados a partir del mismo. Esta técnica se plantea como general para cualquier fluoróforo, ya que todos pueden con una probabilidad determinada llegar a un estado triplete. Los *buffers* utilizados en esta técnica contienen removedores de oxígeno.

Se puede ver que tanto STORM, como dSTORM y GSDIM son técnicas muy similares entre sí, y comparten el mismo principio básico. En muchas ocasiones suele llamarse STORM a los experimentos de súper-resolución realizados con fluoróforos orgánicos a través de su encendido estocástico por haber sido la primera técnica propuesta entre las tres y al no haber diferencias sustanciales entre todas ellas.

La nanoscopía de STORM se utiliza casi exclusivamente en muestras inmovilizadas, como pueden ser las células fijadas, ya que la adquisición de 20.000-30.000 imágenes se realiza en tiempos en el orden de los minutos, y en muestras en células vivas los fluoróforos pueden difundir grandes distancias durante la adquisición. Sin embargo, existen trabajos recientes que han avanzado hacia la implementación de STORM y otras nanoscopías en células vivas^{60,61}. A su vez, STORM puede utilizarse con múltiples colores y gracias al uso de una lente cilíndrica es posible adquirir imágenes en tres dimensiones⁶².

2.3. Otras técnicas

Otra técnica de localización estocástica que se dio a conocer contemporáneamente con STORM es la microscopía de localización fotoactivada, PALM⁴⁵. Su principal diferencia con STORM es el tipo de fluoróforo utilizado, que en PALM son proteínas fotoactivables. Sin embargo, el principio básico es el mismo, ya que se utiliza un láser para enviar pocas proteínas a un estado encendido, que por acción de otro láser son excitadas y enviadas posteriormente a un estado oscuro o son foto-degradadas. La iteración de ciclos de encendido y apagado coincide con el proceso que se realiza en STORM.

Por su parte, la técnica STED (por *Stimulated Emission Depletion*) fue introducida por S. W. Hell en 1994^{41,42}. La misma se basa en utilizar un microscopio confocal adicionando un láser rojo (láser de depleción) con un patrón de irradiación en forma de dona cuyo centro, que posee

intensidad nula, coincide con el centro del láser de excitación. El haz en forma de dona induce una emisión estimulada en los fluoróforos que irradia, siendo longitud de onda del fotón emitido coincidente con la del láser de depleción. Esta emisión se encuentra desplazada hacia el rojo respecto de gran parte de la fluorescencia producida por el haz de excitación y, por lo tanto, puede ser excluida del sistema de detección mediante filtros adecuados. Así, se logra obtener una PSF eficaz cuyo radio es equivalente al hueco de la dona, que puede ser significativamente menor que los 250 nm de la PSF convencional.

Finalmente, otra técnica desarrollada recientemente, conocida como MINFLUX⁴⁸, abre las puertas a una resolución en el orden de 1-5 nm. Un punto importante de esta mejora es el arribo al tamaño molecular, que a su vez tendrá un impacto sobre las marcas fluorescentes, tendiendo progresivamente a sondas del menor tamaño posible en pos de no limitar la resolución alcanzada.

Existe una gran diversidad de técnicas de súper-resolución además de las abordadas en esta sección, así como también mejoras especiales sobre las que hemos mencionado. Sin embargo, una profundización de las mismas excede los objetivos del presente trabajo de tesis.

3. Aplicaciones

La microscopía de súper-resolución se ha utilizado en los últimos años para estudiar diversas estructuras y procesos biológicos. A modo de ejemplos pueden nombrarse el estudio de Hein en células vivas sobre citoesqueleto marcando vimentina y la proteína 2 asociada a microtubulo, así como también de estructuras de membrana como caveolina y conexina-43⁶³; la visualización del movimiento de vesículas sinápticas⁶⁴; la aplicación de STED de dos colores en células vivas marcando el factor de crecimiento epidérmico y su receptor⁶⁵; la combinación de iPALM 3D con microscopía electrónica para estudiar nucleoides mitocondriales⁶⁶; entre otros. En literatura se pueden encontrar trabajos que reúnen distintas aplicaciones de nanoscopías en microbiología⁶⁷, neurobiología⁶⁸ y biología celular⁶⁹.

En el presente trabajo de tesis presentaremos dos temáticas vinculadas a técnicas de microscopía de fluorescencia modernas, incluyendo el uso de la nanoscopía de STORM para el estudio de un sistema de estudio biológico.

En primer lugar, abordaremos la caracterización fotofísica y fotoquímica de una familia de compuestos pertenecientes a la familia de 3-hidroxicromonas. Los mismos presentan un equilibrio tautomérico en estado excitado, contando cada tautómero con un espectro de emisión propio⁷⁰. La dependencia de la posición de dicho equilibrio con distintas propiedades del entorno otorga a

estos compuestos la capacidad de ser buenos sensores de ambientes microheterogéneos, motivo por el cual son utilizados con frecuencia en microscopía de fluorescencia.

En segunda instancia presentaremos la síntesis y propiedades de un antagonista fluorescente diseñado para ser afín al receptor de la hormona liberadora de corticotropina de tipo 1 (CRHR1). Los mecanismos asociados a la señalización mediada por su ligando natural, CRH, están involucrado en la respuesta al estrés y las fallas en su regulación se relacionan con enfermedades como la depresión y la ansiedad^{71,72}. Por otro lado, el compuesto seleccionado para ser sintetizado es un aza-BODIPY con un patrón de sustitución particular, definido por los resultados de estudios de *docking* y por la necesidad de brindar estabilidad fotoquímica a la molécula teniendo en cuenta su aplicación en nanoscopía. El estudio involucra una evaluación de la actividad del aza-BODIPY como antagonista por experimentos de biología molecular y la afinidad entre el aza-BODIPY y CRHR1 por medio de imágenes de STORM a dos colores. El CRHR1 se encuentra fusionado a un *tag* de cMyc en el N terminal lo que permite una inmunomarcación indirecta con fluoróforos como AlexaFluor647. Los experimentos biológicos se realizaron en el Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires, IBIoBA-MPSP-CONICET, en colaboración con el grupo de la Dra. Susana Silberstein.

A continuación, se presentan las motivaciones y los antecedentes vinculados a las dos aplicaciones desarrolladas en esta tesis.

3.1. Estudio de compuestos con emisión dual

La 3-hidroxicromona (3-HC) es la estructura básica de una familia de compuestos que presenta fluorescencia originada en dos diferentes tautómeros en estado excitado⁷³. En estos fluoróforos, luego de la absorción de un fotón tiene lugar una rápida transferencia de protón intramolecular en estado excitado. En muchos casos, se llega a una situación de equilibrio tautomérico para esta transformación. El proceso se conoce como ESIPT, por sus siglas en inglés (*Excited State Intramolecular Proton Transfer*).

La emisión de estos compuestos cuenta con dos bandas: la de menor corrimiento de Stokes corresponde a la fluorescencia de la forma “normal” en estado excitado, N*, y la que presenta su máximo a mayor longitud de onda corresponde al “tautómero” en estado excitado, T*. Esta emisión dual es sensible a diversas propiedades del entorno, por lo que es aprovechada para distintas aplicaciones, destacándose su uso como sensores^{74–76} y en optoelectrónica⁷⁷.

La estructura de 3-HC y la de uno de sus derivados más utilizados, 3-hidroxiflavona (3-HF), se presentan en la Figura 1.14, junto con un esquema del proceso ESIPT para una 3-HF muy

estudiada: la 4-N,N-dietilamino-3-HF (DEAHF)⁷⁸. Allí se puede ver que, tras la absorción de un fotón, DEAHF arriba a un estado N Franck-Condon (N^{F-C}), que relaja vibracionalmente a N^* , a partir de donde se produce la transferencia de protón hasta una situación de equilibrio. Se puede ver que en N^* se da una transferencia de carga desde el grupo dialquilamino (que gana densidad de carga positiva) hacia el oxígeno carbonílico (que aumenta su densidad de carga negativa). Finalmente se produce la emisión dual desde N^* y T^* , y en el estado fundamental la fracción presente como T se convierte en N de forma irreversible⁷⁹.

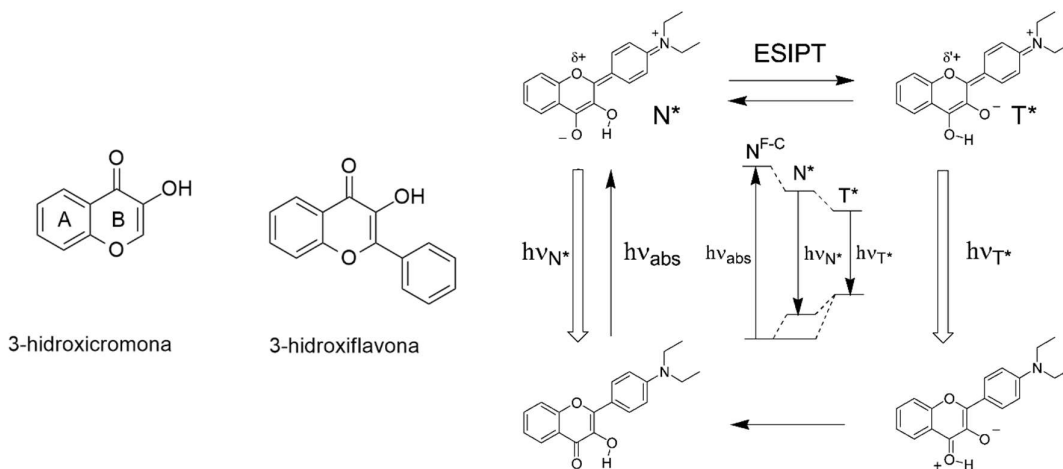


Figura 1.14. Estructura de 3-HC y 3-HF (izquierda). A y B son referencias que utilizaremos para distinguir los dos anillos de 3-HC. Proceso ESIPT para una DEAHF (derecha), tomado del trabajo de Klymchenko⁷⁸.

El parámetro normalmente utilizado para caracterizar el entorno de la sonda ESIPT es la relación de intensidades de fluorescencia estacionaria de la forma normal y la tautomérica, I_{N^*}/I_{T^*} . Esta relación depende de la polaridad y basicidad del medio, así como también de la temperatura. Este parámetro se ha utilizado para evaluar la agregación de la α -sinucleína por cambios en la polaridad del entorno del fluoróforo unido a la proteína, para estudiar la unión de α -sinucleína a distintos tipos de membranas lipídicas y para la detección de cisteína en células vivas⁷⁴⁻⁷⁶.

El estudio del efecto de los sustituyentes se ha llevado a cabo mayormente sobre el anillo B⁸⁰, demostrando por estudios de fluorescencia resuelta en el tiempo que en estado fundamental la única especie presente es N y que la emisión de T^* se genera únicamente después de la transferencia de protón desde N^* ⁸¹⁻⁸³. Por su parte, la sustitución en el anillo A no ha sido explorada en profundidad hasta el momento de escritura de esta tesis. Los pocos trabajos publicados reflejan un comportamiento diferente al que tiene lugar cuando las sustituciones son en el anillo B^{84,85}. Por tal motivo, en el presente trabajo se presenta un estudio sistemático de una familia de 3-HC con sustituyentes dadores y atractores de electrones ubicados en el anillo A, explorando el esquema cinético y energético de transferencia de protón a distintas temperaturas.

Se espera de este modo comprender el comportamiento de estos compuestos en función del tipo de sustituyente en el anillo A, aportando herramientas predictivas que ayuden al diseño y selección de 3-HC sustituidas.

3.2. Localización del receptor de la hormona liberadora de corticotropina de tipo 1 (CRHR1) a través de un antagonista sintético fluorescente

3.2.1. Relevancia del estudio de CRHR1

La hormona CRH es un péptido de 41 aminoácidos que se distribuye en el sistema nervioso central y también en la periferia (testículo, placenta, glándula adrenal, estómago, bazo, piel, timo). Representa un componente importante de la respuesta integrada a estrés, al participar en la regulación de distintos mecanismos del comportamiento y fisiológicos de dicha respuesta a través del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA)⁸⁶. En dicho eje, su actividad se integra con la de otras hormonas como ACTH, glucocorticoides y arginina vasopresina (AVP)⁷¹. Por otra parte, CRH también cumple funciones por fuera del eje HPA⁸⁷. Como se mencionó anteriormente, la desregulación de CRH/CRHR1 se vincula a enfermedades como la depresión y la ansiedad.

CRH acciona mediante dos receptores GPCRs (*G-Protein Coupled Receptors*, por sus siglas en inglés) de clase B, CRHR1 y CRHR2. Estos receptores están codificados por diferentes genes y poseen una alta homología a nivel aminoacídico⁸⁸. En este trabajo de tesis, se abordará el estudio del CRHR1 únicamente. Este receptor se encuentra en el sistema nervioso central, distribuido en corteza, cerebelo, bulbo olfatorio, *medial septum*, hipocampo, amígdala e hipófisis⁸⁹. En la Figura 1.15 se presenta un esquema de las estructuras de CRH y CRHR1, tomadas del trabajo de Hemley⁹⁰. En la activación del receptor, el extremo C-terminal de CRH se une al dominio extracelular correspondiente al extremo N-terminal de CRHR1, mientras la región amino-terminal de la hormona interactúa con un dominio juxtamembrana⁹¹.

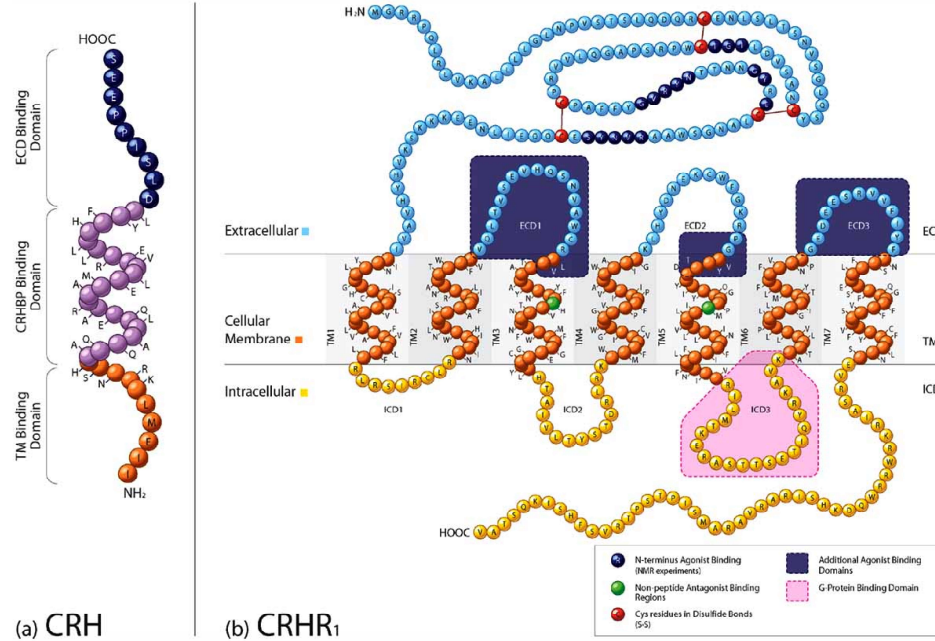


Figura 1.15. (a) Estructura de CRH y (b) de CRHR₁. Con colores se diferencian los distintos dominios. En (b) se pueden ver los 7 dominios transmembrana (TM), dominios intra- y extra-celulares y los C- y N-terminales. Figura tomada del trabajo de Hemley⁹⁰.

En general, los GPCRs responden a estímulos extracelulares tales como la presencia de neurotransmisores, hormonas peptídicas, lípidos, moléculas pequeñas, entre otros. Por tal motivo, estos receptores son el blanco de gran parte de las drogas comerciales^{92,93}.

Los mecanismos de activación de los GPCR involucran la unión de un ligando que estabiliza una conformación activa del receptor, que es afín a la proteína G heterotrimérica (complejo $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$). La unión del receptor con su ligando a la proteína G estimula el intercambio en $G\alpha$ del nucleótido GDP por GTP, favoreciendo la disociación del complejo, tal como se muestra en la Figura 1.16. Posteriormente, las subunidades pueden interactuar con moléculas efectoras que actúan como segundos mensajeros, como puede ser cAMP (AMP cíclico). La hidrólisis de GTP a GDP permite el reensamblado de la proteína heterotrimérica, finalizando el ciclo de activación⁹⁴.

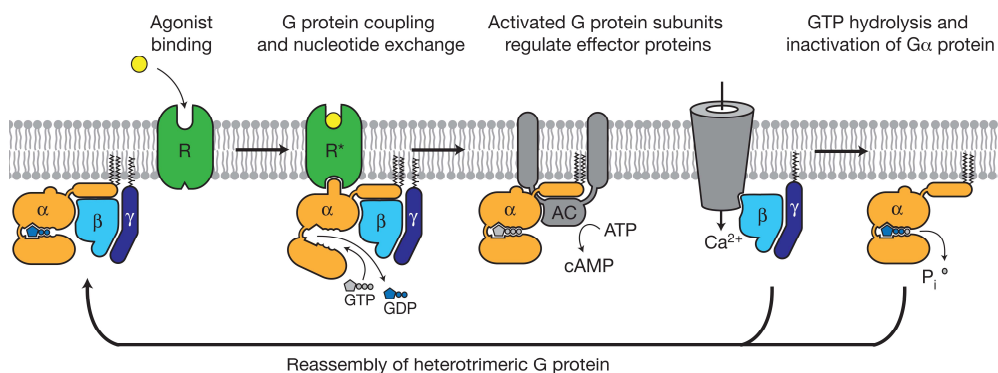


Figura 1.16. Ciclo de activación de proteína G. Figura tomada del trabajo de Rasmussen⁹⁵.

En una visión clásica, luego de ser activados, los receptores son internalizados en endosomas por fosforilación de su cola intracelular a través de proteínas GRKs, por un mecanismo que involucra clatrina y dinamina con el objetivo de desensibilizar la respuesta al disminuir la cantidad de receptores disponibles en superficie⁹⁶. Posteriormente, puede ocurrir un reciclado a la membrana o la degradación del receptor. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado activación de GPCRs una vez desacoplados de la proteína G, señalizando desde endosomas y con un rol importante de las β-arrestinas^{97,98}. Los descubrimientos de vías de activación no canónicas revelaron la elevada complejidad espacio-temporal de la actividad de los GPCRs, que a su vez no se da de igual forma para todos los receptores y contextos. Estos nuevos paradigmas establecen desafíos en lo referido a conocer las dinámicas de los procesos de regulación de cada receptor en cada entorno donde pueda encontrarse.

Si bien CRHR1 se acopla preferencialmente a proteína Gs, aumentando los niveles intracelulares de cAMP, también puede acoplarse en forma promiscua a otras proteínas G, a β-arrestinas y otras proteínas, dando lugar a una amplia posibilidad de respuestas, dependientes del contexto celular⁹⁹. En el laboratorio de la Dra. Susana Silberstein se llevan adelante estudios de mecanismos asociados a CRH en contextos neuronales. En particular, se utiliza la línea hipocámpal murina HT22^{100,101}. Utilizando clones estables que expresan CRHR1 fusionado con un tag cMyc (células HT22-CRHR1) y el biosensor de cAMP basado en FRET, Epac-S^{H187} (células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187})¹⁰², este grupo demostró que el estímulo con CRH produce un incremento rápido de cAMP (1-2 minutos) que se sostiene durante más de 30 minutos. También detectaron en células HT22-CRHR1 una activación bifásica de ERK1/2 (dos MAPKs de 44 y 42 kDa de tamaño, *Extracellular Signal-Regulated Kinases*) por fosforilación, con un máximo de p-ERK1/2 a los 5 minutos y un segundo ascenso de menor magnitud luego de 20 minutos¹⁰³. A su vez, verificaron que la primera fase depende de cAMP generado por tmACs (*Transmembrane Adenylyl Cyclases*) y que la segunda tiene lugar después de la internalización de CRHR1, está mediada por β-arrestina2

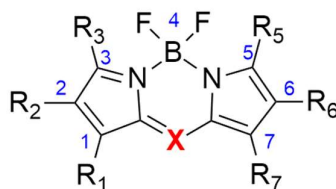
e involucra una fuente de cAMP soluble (sAC, por *Soluble Adenylyl Cyclases*)^{98,104}. Otra observación que realizaron en el laboratorio fue la activación por fosforilación de la proteína Akt a tiempos largos después de estimular CRHR1 con CRH.

El interés farmacológico ha llevado al desarrollo de numerosos antagonistas de CRHR1 en la búsqueda de drogas con fines terapéuticos^{105,106}. En 2013 se cristalizó por primera vez el receptor, y al cristalizarse unido a un antagonista se pudo conocer el tipo de interacciones que presentan los antagonistas con distintos residuos del receptor¹⁰⁷.

La necesidad de contar con biomarcadores que permitan visualizar el sistema CRH/CRHR1, sumado a la falta de anticuerpos específicos para el receptor¹⁰⁸, pone de relieve la importancia de desarrollar sondas fluorescentes que permitan monitorear los complejos procesos y vías que tienen lugar a nivel molecular. Teniendo esto en cuenta, se diseñó y sintetizó un aza-BODIPY que pudiese actuar como antagonista fluorescente, con el objetivo de visualizar CRHR1 por microscopía de súper-resolución.

3.2.2. aza-BODIPYs

Los complejos de BF₂ con (Z)-N-(2H-pirrol-2-yliden-)-1H-pirrol-2-aminas, también conocidas como aza-dipirrometenos, dan lugar a la familia de fluoróforos aza-BODIPY^{109,110}. Estructuralmente, los aza-BODIPYs se relacionan con otra familia de fluoróforos: la del 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno, conocido como BODIPY. Las rutas sintéticas de ambas familias difieren, pero las propiedades espectroscópicas se encuentran vinculadas. En la Figura 1.17 se presentan las estructuras básicas de ambos tipos de compuestos. Las mismas consisten en un *core* aromático compuesto por dos motivos pirrólicos unidos por un puente aza o metino, y un átomo de boro coordinado a los nitrógenos de los pirroles y a dos átomos de flúor. Las distintas posiciones de los pirroles pueden estar sustituidas (en la figura, R₁ a R₇).



X= C (BODIPY) o N (aza-BODIPY)

Figura 1.17. Estructura básica de BODIPYs y aza-BODIPYs.

Los BODIPYs han sido ampliamente utilizados en microscopía de fluorescencia. La versatilidad estructural que se puede hallar en los distintos BODIPYs sintetizados en literatura

gracias a la variedad de sustituyentes en las posiciones 1 a 7 y en la posición *meso* (representada por X en la Figura 1.17), da lugar a fluoróforos con bandas de absorción cuyos máximos se encuentran entre 500 y 650 nm, y emisiones con máximo a longitudes de onda entre 525 y 675 nm¹¹⁰. Generalmente, poseen coeficientes de absorción molar y rendimientos cuánticos de fluorescencia elevados (entre 4 y 11 x 10⁴ M⁻¹cm⁻¹ y 0,20-0,99 respectivamente)¹¹¹. Los compuestos que tienen una extensión de la conjugación aromática a través de sustitución aromática en posiciones 3 y 5 presentan un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda en sus máximos de absorción y emisión¹¹², propiedad deseable para estudios en sistemas vivos. A su vez, los sistemas con conjugación extendida y restricción en la rotación de los enlaces entre los sustituyentes aromáticos y el *core* central del BODIPY poseen corrimiento batocrómico, rendimientos cuánticos de fluorescencia y coeficientes de absorción molar aún mayores que las estructuras que permiten la libre-rotación en torno a dichos enlaces¹¹³. La sustitución aromática en las posiciones 1 y 7 ejerce una influencia apreciablemente menor que en las posiciones 3 y 5¹¹⁴, mientras que los grupos electro-dadores presentes en los sustituyentes aromáticos exacerban el corrimiento hacia menores energías y los atractores lo disminuyen. En cuanto a las propiedades solvatocrómicas, en general, los espectros de los BODIPYs son poco sensibles a cambios en la polaridad del solvente. En los BODIPYs donde es posible la transferencia electrónica foto-inducida (PeT) intramolecular suele existir una dependencia de los máximos de absorción y emisión con la polaridad del solvente¹¹⁰, siendo más frecuente los casos de solvatocromismo positivo.

Por su parte, los aza-BODIPYs presentan una dependencia de sus propiedades espectroscópicas con los tipos de sustituyentes similar a la descrita para los BODIPYs. El reemplazo del puente de carbono en posición *meso* por un nitrógeno tiene un efecto batocrómico, desplazando aproximadamente 70 nm hacia el rojo los espectros de absorción y de emisión¹¹⁵. La gran mayoría de los aza-BODIPY informados en literatura presentan sustituyentes aromáticos en las posiciones 1,3,5 y 7, debido a las dificultades sintéticas que presentan los compuestos con sustituyentes alquílicos en dichas posiciones^{109,116-118}. A su vez, las síntesis de aza-BODIPYs asimétricos es más inusual que la de compuestos simétricos. De este modo, la mayor parte de aza-BODIPYs sintetizados por distintos grupos son tetra-aril sustituidos, por lo que presentan espectros de absorción y emisión a longitudes de onda mayores a 600 nm, con rendimientos cuánticos de fluorescencia similares a los de los BODIPYs análogos.

Los BODIPYs se han utilizado en microscopía de moléculas individuales y en nanoscopía de STED y STORM¹¹⁹⁻¹²². En particular, cuando se utilizó un BODIPY para STORM, el mismo se excitó y pasó a estado oscuro con un láser verde, reactivándose con otro de 405 nm. Por su parte, no se

han encontrado trabajos donde utilicen aza-BODIPYs para técnicas de super-resolución, aunque debe destacarse que su desarrollo como familia es más reciente que la de los BODIPYs, contando con trabajos fundamentales del grupo de O'Shea entre los años 2005 y la actualidad^{123–126}.

En el presente trabajo propusimos un aza-BODIPY asimétrico con un único sustituyente aromático en posición 1 con el objetivo de marcar específicamente al CRHR1 por su capacidad como antagonista. En el Capítulo 2 se describen los métodos empleados para abordar este objetivo, desde el diseño del aza-BODIPY seleccionado, hasta su síntesis y las técnicas utilizadas para evaluar su afinidad por CRHR1. Por otro lado, en el Capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

1. Espectroscopía

1.1. Absorción

Los espectros de absorción de todas las muestras se midieron en un espectrofotómetro de doble haz *Shimadzu UV-3600* en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico (*Hellma Analytics*) con un tapón de teflón para evitar la evaporación de solvente. Las soluciones fueron preparadas en los siguientes solventes, usados directamente de su envase original: acetonitrilo *Optima LC/MS* (*Fisher Chemical*), diclorometano *Optima LC/MS* (*Fisher Chemical*), n-octanol 99% (*Sigma Aldrich*), tolueno *Uvasol* (*Merck*) y metanol *Optima LC/MS* (*Fisher Chemical*). Estos solventes también se utilizaron para los estudios de espectroscopía de fluorescencia.

En todas las mediciones se obtuvo la línea de base utilizando aire tanto en la cubeta de referencia como en la de la muestra. Por otro lado, a todas las muestras se les restó el espectro del solvente adquirido en las mismas condiciones experimentales.

Como criterio general, se procuró ajustar las concentraciones de las distintas muestras con el objetivo de medir absorbancias entre 0,05 y 0,20. De este modo se minimiza la formación de agregados y efectos de filtro interno por altas concentraciones, así como también se logra una relación señal a ruido adecuada. Todos los espectros fueron adquiridos con un nivel de velocidad *media* y 1 nm de ancho espectral.

1.2. Emisión y excitación estacionaria

Los espectros de emisión y excitación estacionaria se obtuvieron en un espectrofluorómetro *PTI QM40*, utilizando cubetas de fluorescencia de cuarzo de 1 cm de paso óptico (*Hellma Analytics*). Para experimentos a temperatura variable, el control térmico se logró a través de un sistema Peltier. Por otro lado, para garantizar una temperatura homogénea en toda la solución, la misma se mantuvo en agitación permanente a través de un buzo y un agitador magnético. Una vez estabilizada la lectura de temperatura por parte del equipo, se esperó durante 5 minutos para asegurar una homogeneización completa. Para temperaturas por debajo de 15°C se circuló un flujo de nitrógeno gaseoso por la cámara que contiene la cubeta, con el objetivo de evitar la condensación de humedad en las paredes de la misma. Estos cuidados también fueron tenidos en cuenta en las mediciones de emisión resuelta en el tiempo (ver inciso 1.4).

En cada determinación se utilizó el mismo ancho de rendija a la entrada y salida de los monocromadores de excitación y de emisión. El valor se ajustó entre 0,5 mm y 1 mm, correspondiendo a un ancho espectral de 2 a 4 nm en cada monocromador. Se buscó obtener una señal en el máximo en el orden $(0,5-1) \times 10^6$ cuentas, procurando estar siempre por debajo del nivel de saturación del detector.

Los espectros de emisión se adquirieron en un intervalo espectral con límite inferior 5-10 nm por encima de la longitud de onda de la luz de excitación, para evitar la detección de luz dispersa. Se utilizó una función de corrección provista por el equipo que compensa la sensibilidad variable que presenta el canal de detección a la luz de distintas longitudes de onda.

Los espectros de excitación se obtuvieron detectando a una longitud de onda que estuviese al menos 5-10 nm por encima del límite superior del intervalo utilizado para irradiar la muestra. Se usó una función que corrige el espectro de excitación en función de las variaciones de intensidad de la lámpara a distintas longitudes de onda.

Tanto los espectros de emisión como los de excitación fueron adquiridos con un tiempo de exposición de 0,1 segundos en pasos de a 1 nm.

El equipo utilizado en la Universidad de Campinas por el Dr. Marcelo Faleiros y la Dra. Teresa Atvars es un *Edinburg Analytical Instruments FL900* con un detector MCP-PMT (*Hamamatsu R3809U-50*). El mismo puede operar en modo de emisión estacionaria o bien usarse para mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo. Las mediciones para el compuesto **2** (ver Capítulo 3) en el intervalo de -70 a 50°C se realizaron en tubos de cuarzo sellados. Durante el proceso de sellado, la muestra fue congelada con N₂ líquido. El control de temperatura en estas mediciones se realizó con un criostato de helio de ciclo cerrado (*APD Cryogenics D204*), utilizando un controlador de temperatura *Digital* modelo 9650.

1.3. Anisotropía de fluorescencia

La anisotropía de fluorescencia (r) es un fenómeno ampliamente conocido¹. Su valor es una medida del grado de polarización de la luz producida en la emisión fluorescente, y está relacionado a la orientación relativa de los momentos de transición para la absorción y la emisión. A su vez, la anisotropía puede disminuir por la presencia de procesos que despolaricen la emisión, como un movimiento rotacional, una transformación en estado excitado o una transferencia de energía. En soluciones isotrópicas, el valor máximo de r es igual a 0,4 y corresponde a una alineación exacta entre el momento de transición de absorción y de emisión para la molécula en estudio, en ausencia de procesos que despolaricen la emisión durante el tiempo que dura la

misma. Se pueden obtener valores negativos de hasta -0,2, correspondientes a un ángulo de 90° entre el momento de transición de absorción y el de emisión (también en ausencia de cualquier proceso de despolarización).

Para conocer el valor de r de una solución es necesario medir la intensidad de fluorescencia excitando con luz polarizada en una dada dirección y detectando la emisión en una dirección paralela ($I_{||}$) y en una perpendicular (I_{\perp}) a la dirección de excitación. En la Ecuación 2.1 se puede ver la relación entre estos parámetros y r .

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad [2.1]$$

Las mediciones de anisotropía se realizaron en el equipo *PTI-QM40* mencionado en el inciso 1.2. Con el objetivo de conocer I_{\perp} y $I_{||}$ se usó el típico procedimiento que utiliza dos polarizadores de película de polímero colocados entre la muestra y cada uno de los monocromadores¹. Los polarizadores poseen un mecanismo para el movimiento de su eje de forma tal de permitir el paso de luz polarizada perpendicular al plano de incidencia (plano vertical) o paralela al mismo (plano horizontal). En la Figura 2.1 se muestra un esquema tomado del trabajo de Vinegoni¹²⁷, donde la luz de excitación está polarizada en dirección vertical y la detección de la emisión puede alternar entre la polarización vertical, I_{VV} (por vertical-vertical), o perpendicular, I_{VH} (vertical-horizontal). Dado que la sensibilidad del canal de emisión es diferente para luz polarizada en sentido vertical y horizontal, es necesario realizar una corrección para obtener I_{\perp} y $I_{||}$ a partir de I_{VH} y I_{VV} . La misma consiste en realizar una excitación horizontal y detecciones en dirección horizontal (I_{HH}) y vertical (I_{HV}), para obtener finalmente el factor de corrección $G = I_{HV}/I_{HH} = I_{VV}I_{\perp}/I_{VH}I_{||}$ (ver demostración en el libro de Lakowicz¹).

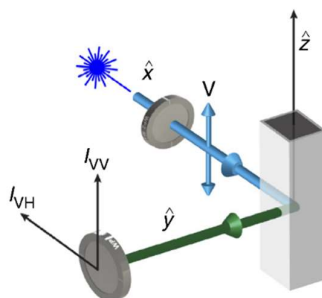


Figura 2.1. Representación de un experimento típico de medición de anisotropía de fluorescencia. El polarizador de excitación está colocado en posición vertical, mientras que el de emisión puede colocarse en posición vertical para dar I_{VV} o en horizontal para dar I_{VH} . Tomado del trabajo de Vinegoni¹²⁷.

Como el uso de polarizadores disminuye la intensidad de luz que arriba al detector, se utilizó un tiempo de integración de 0,5 segundos con el fin de obtener una buena relación señal a ruido, manteniendo los demás parámetros como fueron descritos en la sección 1.2.

1.4. Emisión resuelta en el tiempo

Los experimentos de fluorescencia resuelta en el tiempo se realizaron en un equipo *IBH-Horiba –Jovin-Ivon Time Correlated Single Photon Counting*. La temperatura fue controlada por el flujo de una mezcla refrigerada de etilenglicol-agua (criotermostato de circulación *Julabo F32-HL*) a través del portacubetas termostatizable del equipo. Los espectros del derivado de 3-hidroxicromona **2** (ver Capítulo 3) medidos en Campinas se adquirieron con el equipo *Edinburg Analytical Instruments FL900* que ya fue descrito en la sección 1.2, al igual que el sistema de control de temperatura.

La técnica de *Time Correlated Single Photon Counting* (TCSPC) se basa en la utilización de una fuente de luz pulsada (láser o diodo láser) a frecuencias en el orden de los MHz y la posterior detección de fotones individuales provenientes de la muestra¹²⁸. El tiempo transcurrido entre el pulso de luz y el arribo del primer fotón al detector es usado a través de muchas repeticiones del experimento para obtener un histograma de tiempo de arribo de fotones. En esta técnica es importante lograr que la probabilidad de detectar dos fotones con un único pulso sea baja. Como regla general, se debe obtener una tasa de emisión de la muestra que valga el 1-3% de la frecuencia de excitación. En la Figura 2.2 se presenta un esquema adaptado de la nota técnica de Wahl que resume el proceso de adquisición y muestra la construcción del histograma¹²⁸.

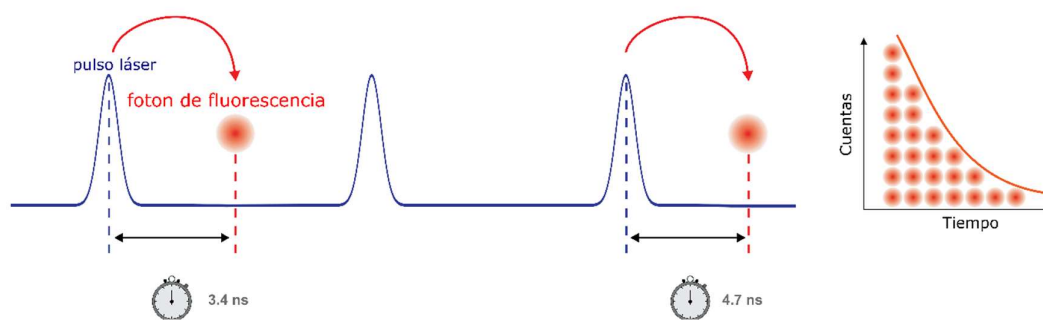


Figura 2.2. Representación del proceso de adquisición en TCSPC. A la izquierda se muestra en azul los pulsos de láser, en rojo los eventos de detección de fotón y debajo de la curva azul se puede ver el tiempo transcurrido entre el pulso y la detección. A la derecha se presenta el armado del histograma que refleja el decaimiento de fluorescencia de la muestra. Adaptado del trabajo de Wahl¹²⁸.

Para las mediciones en derivados de 3-hidroxicromonas se utilizó como fuente de excitación un diodo láser *Horiba Jobin Yvon 405 nm LED*, con <100 ps de ancho de pulso y 1 MHz de frecuencia de repetición. El monocromador de excitación se usó en 410 nm. La obtención del

pulso se llevó a cabo utilizando un vidrio dispersor esmerilado dispuesto a 45° en lugar de la muestra. En dicha adquisición, se trabajó con el monocromador de emisión también ajustado en 410 nm. En el haz de excitación se colocó un polarizador en posición vertical. Las rendijas de ambos monocromadores, que poseen siete posiciones (1, 2, 4, 6, 8, 16 y 32), se colocaron en posición 6 para la medición del pulso. Al introducir la muestra, se trabajó con ambas rendijas en 32 (máxima apertura), el monocromador de excitación en 410 nm y el de emisión en posiciones variables según se quisiera detectar la banda N* o la banda T* (ver Capítulo 3). En estas mediciones se colocó un filtro *GG495* (*Schott*, 2 mm) para evitar la llegada de luz dispersa al detector, así como un polarizador ubicado en el ángulo mágico para evitar efectos de polarización. La adquisición se realizó hasta llegar a 5.000 o 10.000 cuentas en el máximo, trabajando en un rango de 50 ns con 8192 canales (6,86 ps/canal). Habiendo registrado los pulsos y decaimientos, se realizaron deconvoluciones mono- y biexponenciales con el programa *IBH Data Station*. Las mediciones realizadas en Campinas fueron llevadas adelante con un diodo láser pulsado *Picoquant LDH-D-C-405nm* (ancho de pulso 150 ps). El resto de las condiciones de adquisición se mantuvieron iguales.

Los espectros de emisión resueltos en el tiempo (TRES, por *Time Resolved Emission Spectra*) de los derivados de 3-hidroxicromona se realizaron en las mismas condiciones que las descriptas en el párrafo anterior, variando únicamente la longitud de onda del monocromador de emisión en intervalos de 10 nm entre 460 y 660 nm. Para reconstruir el espectro de emisión a distintos tiempos, se partió de la dependencia de la intensidad con el tiempo y la longitud de onda que se presenta en la Ecuación 2.2. La misma está descripta por una suma de dos exponenciales que tienen asociadas una amplitud (A_i) y tiempo característico (τ_i ; el proceso de menor tiempo característico recibe el nombre de rápido). Los tiempos de vida y amplitudes correspondientes a cada longitud de onda se obtuvieron mediante la deconvolución previamente descripta. Por otro lado, la intensidad integrada en el tiempo se compatibilizó con el espectro estacionario corregido a cada longitud de onda, hallando un factor $f(\lambda) = \frac{I(\lambda)_{estacionaria}}{\int I(\lambda, t) dt}$ que se multiplicó por $I(\lambda, t_i)$ para cada tiempo “i” al que se reconstruyó un espectro. Este método es bien conocido y se pueden encontrar mayores detalles del mismo en el libro de Lakowicz¹.

$$I(\lambda, t) = A_1(\lambda) \exp\left(\frac{-t}{\tau_{rápido}}\right) + A_2(\lambda) \exp\left(\frac{-t}{\tau_{lento}}\right) \quad [2.2]$$

En la determinación del tiempo de vida de ABP-09 (ver Capítulo 4) se utilizó un diodo láser *Horiba Jobin Yvon 457 nm LED* con un ancho de pulso de 1,3 ns como fuente de excitación, pulsado a 1 MHz. El monocromador de excitación se usó en 460 nm y las dos rendijas en 32. Se trabajó en un rango de 50 ns utilizando 1024 canales (0,055 ns/canal). Se utilizó un filtro *GG495* (*Schott*,

2mm) para evitar la llegada de luz dispersa. También se usaron polarizadores en los canales de emisión y de excitación, tal como se describió anteriormente, a fin de evitar efectos de polarización. La medición del pulso se realizó con el vidrio esmerilado mencionado anteriormente, utilizando ambos monocromadores en 460 nm y las dos rendijas en 6 y 6. Para realizar la deconvolución y obtener el tiempo de vida del fluoróforo se utilizó el programa *IBH Data Station*.

2. Nanoscopía de fluorescencia STORM

2.1. Dispositivo experimental

El nanoscopio de STORM se encuentra instalado en el Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION). El mismo está construido alrededor de un microscopio comercial Olympus IX73. En la Figura 2.3 se muestra la disposición de los principales componentes del nanoscopio, que además del microscopio comercial cuenta con diversas piezas ópticas e instrumentos colocados en forma manual. El montaje del nanoscopio estuvo a cargo del Dr. Federico Barabas durante su tesis de doctorado bajo la supervisión del Dr. Fernando Stefani⁵⁵.

Todos los espejos son espejos dieléctricos (*Thorlabs BB1*) y las lentes son dobletes acromáticos de una pulgada de diámetro (a menos que se indique un valor diferente), con una cubierta anti-reflexión para luz visible.

Como fuente de excitación el microscopio cuenta con un láser de 532 nm (*Laser Quantum Ventus 532*, 1,5 W) y otro de 642 nm (*MPB Communications 2RU-VFL-P-1500-642*). Las lentes L1 y L2 (distancias focales de 45 mm y 75 mm, respectivamente) forman un telescopio que agranda la cintura del láser rojo desde 1 mm hasta 1,5 mm para igualarla a la del láser verde. El espejo dicróico pasa-bajo ED1 (*Semrock LM01-552-25*) refleja el haz verde y permite la transmisión del rojo.

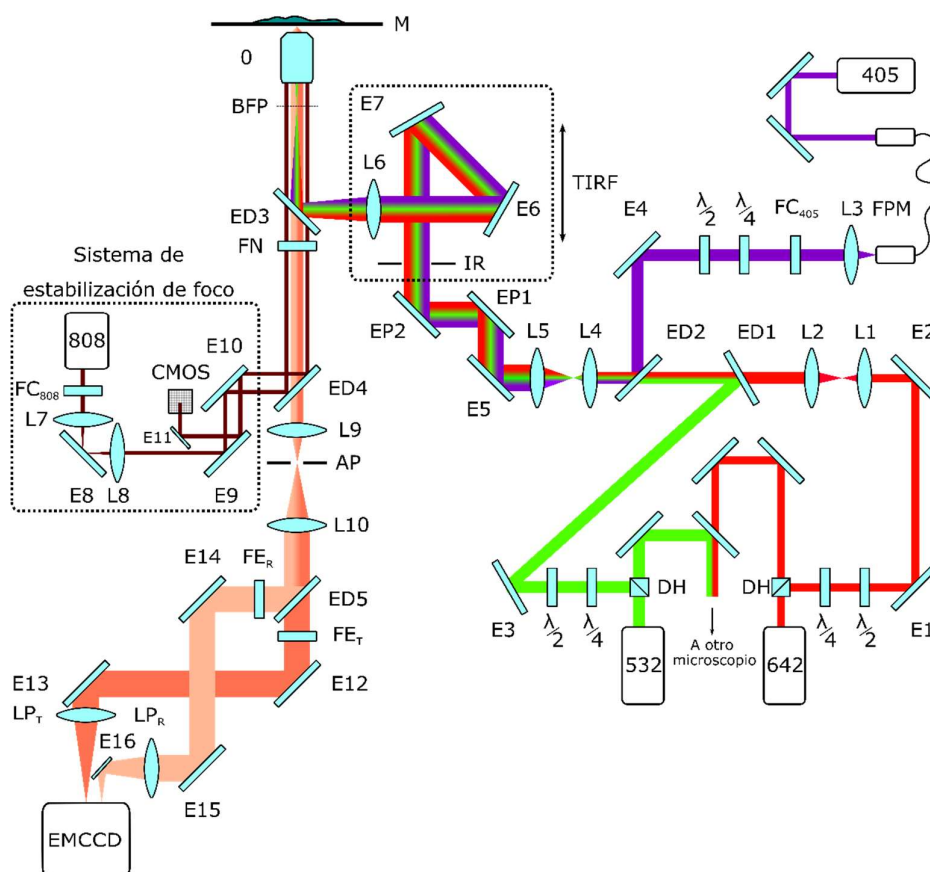


Figura 2.3. Esquema de la disposición de componentes del nanoscopio de STORM. Adaptado de la tesis de F. Barabas⁵⁵. E: Espejos, L: lentes, DH: divisor de haz, $\lambda/2$: lámina retardadora de media onda, $\lambda/4$: lámina retardadora de cuarto de onda, FC: filtros *clean-up*, FPM: fibra óptica polarización monomodo que conserva el estado de polarización; ED: espejos dicroicos, EP: espejos de periscopio, TIRF: estación motorizada para pasar a iluminación TIRF, IR: iris, BFP: *back focal plane* del objetivo, O: lente objetivo, FN: filtro *notch*, CMOS: cámara CMOS (web-cam) utilizada en el sistema de estabilización de foco, AP: apertura, FE: filtros de emisión (R canal reflejado, T canal transmitido), LP: lentes de proyección, EMCCD: cámara *electron-multiplying charge coupled device*.

Un diodo láser de 405 nm (*RGB Photonics Lambda Mini*) se utiliza para reactivar el estado emisor de cianinas como AlexaFluor647 y otros fluoróforos como ABP-09, devolviéndolos a su estado brillante (este fenómeno se presentó y discutió en el Capítulo 1). El láser se acopla en primer lugar a una fibra óptica monomodo, que conserva el estado de polarización de la luz (*Thorlabs P3-405BPM-FC-2*), con un acoplador de fibra (*Schäfer+Kirchoff 60FC-4-A7.5-02*). La lente L3 (distancia focal 30 mm) colima el haz que sale de la fibra y posteriormente su espectro es filtrado por un filtro *clean-up* FC_{405} (*Semrock FF01-405/10-25*). El espejo dicroico pasa-bajo ED2 (*Semrock LM01-427-25*) se usa para combinar el láser de 405 nm con los de 532 nm y 642 nm.

Todos los láseres pasan por láminas retardadoras de cuarto y media onda específicas para cada longitud de onda (*Thorlabs*) con la finalidad de arribar a la muestra con luz de excitación circularmente polarizada.

Las lentes L4 y L5 (30 mm y 150 mm de distancia focal, respectivamente) forman un telescopio 5x que expande los tres láseres. El iris (IR) permite limitar la región de iluminación en la muestra. Por otro lado, la lente L6 (distancia focal 300 mm y 2 pulgadas de diámetro) enfoca los haces en el *back focal plane* del objetivo (BFP). La plataforma TIRF de la Figura 2.3 está montada sobre una estación móvil lineal motorizada (*Thorlabs KMTS50E/M*). Al mover esta plataforma, el foco de los láseres se mueve lateralmente sobre el BFP, permitiendo alternar entre iluminación de campo amplio y de tipo TIRF.

Entre L5 y E5 hay un filtro neutro de densidad 3 que no se muestra en la figura y se encuentra montado sobre una base motorizada. Cuando el mismo se encuentra en posición vertical y los haces pasan a través suyo, la iluminación suele ser de una potencia similar a la de microscopía convencional. Contrariamente, cuando se encuentra en posición horizontal y los láseres no lo atraviesan, los mismos llegan a la muestra con una potencia 1.000 veces mayor. Las condiciones de adquisición de imágenes de STORM corresponden a este último caso (5-30 kW/cm² de flujo de energía sobre la muestra). La intensidad de luz se mide con un fotodiodo que se encuentra calibrado entre 0,2 y 30 kW/cm².

La lente objetivo (*Olympus PLAPON 60x*) posee una apertura numérica de 1,42. Este elevado valor de AN permite recolectar una gran cantidad de fotones, mejorando la precisión de localización de moléculas individuales. A su vez, permite trabajar con iluminación TIRF.

La luz emitida desde la muestra atraviesa un espejo dicróico multibanda (ED3, *Semrock Di03-R405/488/532/635-t1-25x36*), que permite utilizar diferentes láseres de excitación en forma simultánea. El filtro *notch* (FN, *Semrock NF03-405/488/532/635E-25*) permite filtrar luz remanente proveniente de los láseres.

La lente L9 es la lente de proyección original del microscopio Olympus. Con la lente L10 (distancia focal 75 mm, cubrimiento antireflex VIS/IR) se realiza un nuevo colimado de la emisión. La apertura manual (AP, *Ealing*) se encuentra dispuesta en el plano focal entre L9 y L10.

La disposición de elementos a partir de L10 puede variar, en función del uso de uno o dos colores. En el Capítulo 4 se realizaron determinaciones a dos colores, por lo cual se explica la disposición correspondiente a dicho modo. El espejo dicróico ED5 (*Chroma ZT647rdc*) separa los fotones correspondientes a cada color. El canal transmitido y el reflejado cuentan con sus propios filtros de emisión, FE_T (*Chroma ET700/75*, utilizado para AlexaFluor647) y FE_R (*Semrock 582/75 BrightLine HC* para ABP-09). En la Figura 2.4 se muestran los espectros de emisión y de absorción normalizados de ABP-09 y AlexaFluor647, y superpuestos se presentan los filtros de emisión y

láseres de excitación utilizados. Allí puede verse que la excitación de ambas moléculas se realiza cerca del máximo de absorción de cada una de ellas, mientras que los filtros de emisión permiten el paso de la mayor parte de la fluorescencia de cada fluoróforo. Por otro lado, la detección de moléculas de ABP-09 en el canal de AlexaFluor647 es despreciable y lo mismo ocurre en el caso inverso.

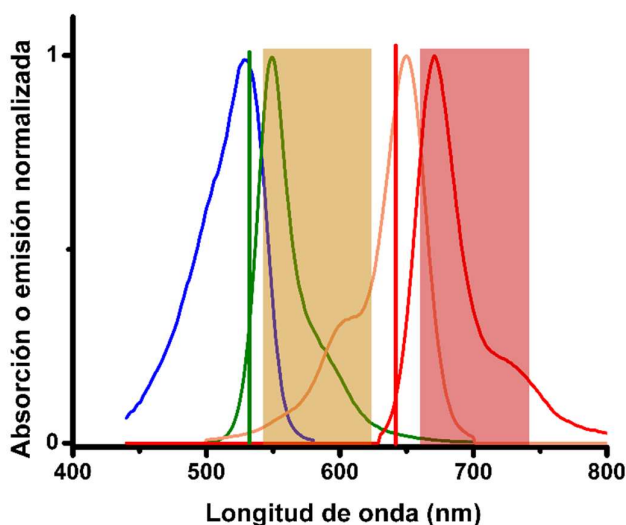


Figura 2.4. Espectros de absorción y de emisión de ABP-09 (absorción: azul; emisión: verde) y AlexaFluor647 (absorción: naranja; emisión: rojo). La línea vertical verde señala la longitud de onda del láser de excitación de ABP-09 (532 nm) y la roja la del AlexaFluor647 (642 nm). El rectángulo naranja señala el intervalo de longitudes de onda transmitidos por el filtro de emisión del canal de ABP-09, mientras que en el rojo se muestran las del canal de AlexaFluor647.

La luz de cada canal es enfocada en regiones independientes de la cámara EMCCD (*Andor iXon3 897 DU-897D-CS0-#BV*) a través de las lentes de proyección LP_T y LP_R (distancia focal 150 mm). La presencia de las lentes L_{10} y LP_T / LP_R incrementan la magnificación del objetivo hasta un valor de 120x (si se usase la lente de proyección original del microscopio, L_9 , la magnificación sería 60x). De este modo, teniendo en cuenta que el tamaño real de píxel en la cámara es de 16 μm , el tamaño de píxel en el dominio del objeto es de 133 nm. Este valor es adecuado para la medición de moléculas individuales.

El sistema de estabilización de foco, por su parte, consiste en un diodo láser de 808 nm que se acopla mediante una fibra óptica monomodo (*Thorlabs P3-405BPM-FC-2*) con un colimador de fibra (*Schäfer+Kirchoff 60FC-4-A7.5-02*) para filtrar espacialmente el haz. El diámetro obtenido es de aproximadamente 1 mm y la potencia es cercana a 2 mW. Con un filtro *clean-up* se realiza un filtrado espectral (FC_{808} , *Chroma ZET808/15x*). Las lentes L_7 y L_8 ($f = 50$ mm, cubrimiento anti-reflexión IR) y el espejo E_8 permiten el movimiento del haz paralelo al eje del objetivo. El espejo

dicróico ED4 (*Semrock FF750-SDi02-25x36*) acopla al haz de 808 nm en el camino del resto de los láseres hacia la muestra. La entrada del láser infrarrojo es en modo de reflexión total interna, y esto genera que cualquier cambio en la distancia entre el objetivo y la muestra cause un desplazamiento en el haz reflejado, que es monitoreado en la cámara CMOS. La posición del centro de masa del haz en la cámara se toma como referencia de retro-alimentación de un controlador PID para mantener el sistema en foco. El desplazamiento es corregido moviendo el control de foco fino del microscopio con un motor (controlador *Prior ProScanIII*). El rendimiento de este sistema es de aproximadamente 40 nm con un tiempo de retorno de 1-2 segundos.

El programa utilizado para controlar el nanoscopio se llama Tormenta y fue desarrollado por el Dr. F. Barabas¹²⁹.

2.2. Calibración para imágenes de dos colores

Los canales correspondientes a cada color pueden tener diferencias en la magnificación y rotación de la imagen, por lo que debe realizarse una calibración que halle una matriz de corrección, a fin de tener una correspondencia confiable entre las dos imágenes. Para ello, se prepararon muestras de esferas fluorescentes visibles en ambos canales (*Life Technologies Tetraspeck 0.1 μm*) en una concentración donde se vieran esferas individuales ($\sim 0,05$ esferas/ μm^2). Posteriormente, se corrió un programa hecho por el Dr. Barabas que calcula la matriz que minimiza las distancias entre los mismos marcadores observados en cada canal⁵⁵. Finalmente, esta matriz se carga en el programa Tormenta y el mismo la utiliza para corregir las imágenes adquiridas.

La preparación de la solución de esferas fluorescentes consistió en los siguientes pasos:

- 1) Montar una cámara de flujo con un cubreobjetos de 22 mm y un portaobjetos. Para ello, se debe proseguir como se indica a continuación.
 - a. Sonicar el cubreobjetos y el portaobjetos en agua MiliQ tres veces durante 10 minutos cada vez. Secar con N_2 .
 - b. Cubrir los lados largos del portaobjetos con cinta bifaz, dejando un corredor sin cubrir en el centro.
 - c. Dejar descubierta la parte superior de la cinta bifaz y pegar el cubreobjetos sobre ella. Presionar con la punta de una pipeta las zonas de contacto entre la cinta y el cubreobjetos para asegurar una buena adhesión. De este modo se crea una cámara de 25-30 μL entre el cubreobjetos y el portaobjetos.
 - d. Quitar el exceso de cinta bifaz.

- 2) Sonicar la solución comercial que contiene las esferas fluorescentes durante 5 minutos.
- 3) Diluir 1 μL de solución en 200 μL de PBS. Agitar.
- 4) Hacer fluir 30 μL de la solución diluida en la cámara de flujo. Dejar en contacto 15 minutos.
- 5) Lavar con 200 μL de PBS.
- 6) Sellar con esmalte.

2.3. Limpieza de cubreobjetos

Al trabajar en la detección de moléculas individuales, se debe tener especial cuidado en la limpieza de los materiales utilizados y en su manipulación. La presencia de impurezas como materia orgánica o polvo puede dar lugar a una señal de fluorescencia o de dispersión del haz de excitación que interfieran con la emisión proveniente del fluoróforo. Por tal motivo, se optimizó un protocolo de limpieza de cubreobjetos, cuya efectividad fue evaluada a través de imágenes adquiridas en condiciones de excitación y detección similares a la de los experimentos de STORM.

A continuación, se presentan los pasos de limpieza y en la Figura 2.5 se muestra la comparación entre un cubreobjetos tratado y uno sin tratar. Se puede ver que el tratamiento deja libre de suciedad el cubreobjetos, permitiendo su uso para experimentos de moléculas únicas. En el pie de figura se indican las condiciones de adquisición.

- 1) Colocar los cubreobjetos en un soporte de teflón que permita el contacto de toda la superficie de vidrio con los medios de limpieza utilizados.
- 2) Sonicar los cubreobjetos montados en el soporte de teflón en la siguiente serie de solventes:
 - a. 10 minutos en acetona calidad HPLC (Acetona Optima HPLC/LC, *Fisher Chemical*).
 - b. 10 minutos en solución de Hellmanex II (*Hellma Analytics*) 0,2% v/v en agua MiliQ.
 - c. 10 minutos en agua MiliQ.
- 3) Transportar los cubreobjetos en el soporte de teflón envuelto en papel de aluminio hasta estufa de secado. Secar a 100°C durante al menos 1 hora.
- 4) Introducir el soporte con los cubreobjetos (sin papel de aluminio) en un limpiador de plasma (*Zepto, Diener Electronic*). Llevar a cabo los siguientes pasos:

- a. Colocar un filtro de membrana para partículas (220 micrones) en la entrada de aire.
 - b. Colocar la tapa del limpiador de plasma y hacer vacío durante 3 minutos.
 - c. Dejar entrar “Gas 1” (el aire filtrado) hasta un nivel de 0,5 (indicador del equipo). Luego de 1 minuto cerrar la entrada de gas.
 - d. Esperar otro minuto y encender el plasma, colocando previamente la potencia en 20%. Esperar 5 minutos.
 - e. Volver a repetir los pasos iii y iv totalizando 25 minutos de plasma encendido.
- 5) Utilizar los cubreobjetos luego de terminar la limpieza. Manipular con pinza de teflón sometida al mismo tratamiento de limpieza que los cubreobjetos y usar guantes libres de polvo.

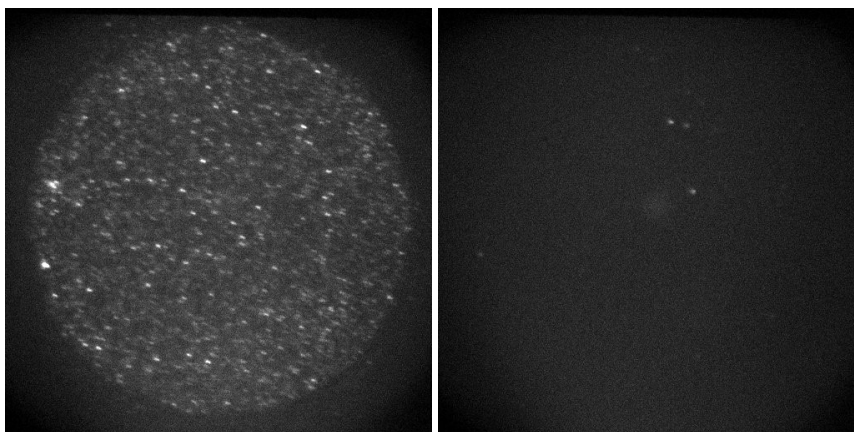


Figura 2.5. Imagen de un cubreobjetos sin tratar (izquierda) y tratado con el protocolo de limpieza (derecha). Ambas corresponden al primer cuadro de un video de 500 cuadros. En los dos casos se enfocó la muestra, se movió lateralmente sin perder el foco y se inició instantáneamente la grabación, para evitar la fotodegradación de las impurezas. Condiciones de adquisición: Láser de excitación: 532 nm; Potencia: 1,3 kW/cm²; Campo: 512x512 pixeles; Tiempo de exposición: 50 ms; Frecuencia de cuadro (*frame rate*): 6,6 Hz; Filtro de emisión: *Semrock 582/75 BrightLine HC*; Pre-Amp Gain: 5.1; EM Gain: 50. Escala de grises: 200-2.000 (mín-máx) para ambas imágenes.

2.4. Análisis de imágenes

Las películas grabadas fueron de 20.000 cuadros. Las mismas fueron procesadas con *Thunderstorm*¹³⁰, un *plugin* de *Fiji-ImageJ*¹³¹. Además de cargar las imágenes en el programa, se deben introducir distintos parámetros de la cámara y el microscopio, como el tamaño de píxel, la eficiencia cuántica, el nivel basal de cuentas o el número de fotoelectrones por cuenta. Por otro lado, debe indicarse la ganancia EM utilizada.

El programa realiza un análisis automático, en el que detecta la presencia de moléculas individuales en cada cuadro distinguiéndola del fondo. Para esta detección se debe elegir un valor

límite de intensidad que permita al programa encontrar máximos locales. Luego de identificarlas, lleva a cabo un ajuste gaussiano bidimensional del patrón de intensidad con una precisión que se encuentra relacionada a la cantidad de fotones emitidos (ver discusión en la sección 1.2.1. del Capítulo 1). A su vez, el programa realiza una corrección de corrimientos laterales. Finalmente, reconstruye una imagen de súper-resolución superponiendo todas las localizaciones en una única imagen. También ofrece una tabla con información sobre cada molécula localizada (posición, precisión de localización, cuadros en donde estuvo encendida, desvío estándar de la función gaussiana, intensidad), y puede realizar distintos tipos de histogramas.

La imagen reconstruida se puede obtener de distintos modos: o bien convirtiendo cada cuadro en una imagen binaria, con valor 1 en el centro de cada localización y 0 en el resto, o bien reproduciendo una gaussiana en cada localización, con el desvío y centro obtenidos a partir del ajuste. Una discusión sobre distintas formas de visualizar imágenes de localizaciones se puede hallar en el trabajo de Baddeley¹³².

La imagen de súper-resolución, a su vez, contiene un mayor número de píxeles. Teniendo en cuenta la precisión obtenida, se puede ajustar el tamaño de píxel a un valor similar a la misma, ya que un píxel de menor tamaño tendrá una peor relación señal a ruido, mientras que uno de mayor de tamaño desaprovechará la precisión alcanzada.

2.5. Condiciones experimentales

Las condiciones de excitación y de adquisición de imágenes de STORM del Capítulo 4 fueron las siguientes:

- **Potencia de excitación láser 532 nm:** 5 a 7 kW/cm²
- **Potencia de excitación láser 642 nm:** 5 a 7 kW/cm²
- **Tiempo de exposición:** 30 ms
- **Frecuencia de cuadro:** 33 Hz
- **Tamaño de área de observación:** 243 x 116 píxeles para cada canal
- **Ganancia Pre-Amp:** 5.1
- **Ganancia EM:** 40

A su vez, las opciones utilizadas en *Thunderstorm* para el procesamiento de imágenes fueron las que se presentan a continuación:

- **Tamaño de píxel:** 133 nm
- **Fotonelectrones por cuenta A/D:** 3,6 (especificación técnica de la cámara)

- **Eficiencia cuántica:** 0,9 (especificación técnica de la cámara)
- **Nivel basal (cuentas A/D):** 414 (especificación técnica de la cámara)
- **Ganancia EM:** 40
- **Filtro:** *Wavelet filter (B-Spline)*, *B-spline order 3*, *B-spline scale 2* (opciones recomendadas para una buena detección de moléculas cuando el ancho a media altura del patrón de intensidad de la PSF ocupa 2 a 5 píxeles, como es el caso del presente trabajo)
- **Localización aproximada de moléculas:** Método *Local maximum*, Valor límite de intensidad: $2 \cdot \text{std}(\text{Wave.F1})$, Conectividad: *8-neighbourhood*. Estas opciones son las recomendadas por el programa para una buena detección de moléculas a partir de la imagen filtrada. Al variar el valor límite de intensidad -entre 0,5 y $2 \cdot \text{std}(\text{Wave.F1})$ -, se cambia la exigencia con la cual se evalúa la presencia de una molécula. Un valor elevado da como resultado una menor cantidad de falsos positivos, pero una mayor cantidad de moléculas perdidas, y viceversa.
- **Localización sub-píxel de moléculas:** Método *PSF: Integrated Gaussian*, Radio de ajuste: 3 px, Método de ajuste: *Weighted Least squares*, Sigma inicial: 1,6 px. Estas opciones corresponden al ajuste gaussiano que realiza el programa sobre las moléculas localizadas, para obtener una localización sub-píxel.
- **Visualización de resultados:** Método: *Normalized Gaussian*, Magnificación: 10x, Frecuencia de actualización: 50 *frames*, Precisión lateral: 20 nm. Con estas opciones, se muestra una imagen reconstruyendo las gaussianas ajustadas utilizando un tamaño de píxel de 13,3 nm. Este valor está de acuerdo con la precisión lograda de 23-26 nm (ver Capítulo 4).

Los filtros de emisión utilizados fueron descriptos en la sección 2.1. del presente capítulo, mientras que la preparación de muestras se presenta en la sección 4.5 del mismo capítulo.

3. Síntesis y caracterización de compuestos

3.1. Solventes y reactivos

Los solventes utilizados para síntesis fueron los de mayor pureza disponible. El diclorometano (>99,5%, Grado Plaguicida), metanol (>99,8%, calidad para análisis A.C.S.), ciclohexano (>99%, calidad para análisis A.C.S.), acetato de etilo (>99,5%, calidad para análisis A.C.S.), acetona (>99,5%, calidad para análisis A.C.S.), etanol absoluto (>99,5%, calidad para análisis A.C.S.) y anhídrido acético (calidad para análisis A.C.S.) fueron comprados a *Sintorgan*. El ciclohexano y el acetato de etilo fueron destilados antes de ser usados.

El ácido sulfúrico (95-98%, calidad para análisis A.C.S.), ácido acético glacial (>99%, calidad para análisis), ácido clorhídrico (36,5-38%, calidad para análisis A.C.S.), hidróxido de sodio (lentejas, >97%), bicarbonato de sodio (>99%, para análisis), sulfato de sodio anhidro (>99%, para análisis) acetato de amonio (>97%, para análisis) y cloruro de sodio (>99%, para análisis) fueron comprados a *Biopack*.

2,4-Dimetilpirrol (97%), 2,4-Diclorobenzaldehído (99%), *N,N*-Diisopropiletilamina (DIPEA, 99,5%), nitrometano (>95%), $\text{BF}_3 \cdot \text{OC}_4\text{H}_{10}$ (para síntesis) y dietilamina (99,5%) fueron comprados a *Sigma Aldrich*.

Las purificaciones en columnas cromatográficas se llevaron a cabo usando sílica gel (*Silica Gel 60, 70-230 Mesh, Merck*). Las separaciones en placas preparativas se realizaron sobre placas de CCD (cromatografía en placa delgada) de aluminio recubiertas con Silica Gel 60 sin indicador fluorescente (*Merck*).

3.2. Síntesis de compuestos 1, 2, 2a, 3 y ABP-09

En esta sección se indican los pasos seguidos en la síntesis de los compuestos **1-3**, **2a** y ABP-09, todos ellos presentados en el Capítulo 4. Los espectros de RMN y espectrometría de masa se presentan en el Apéndice I, junto con la asignación de picos. La síntesis de los compuestos utilizados en el Capítulo 3 no es abordada, ya que la misma fue llevada adelante por la Dra. Giordano¹³³.

- Compuesto **1**, (E)-4-(2,4-Diclorofenil)-but-3-en-2-ona (adaptada del trabajo de Wang¹³⁴). Se disolvieron 1,575 g (9 mmol) de 2,4-Diclorobenzaldehído en una mezcla de acetona (460 mL, exceso) y agua (360 mL). Se agregó gota a gota una solución de hidróxido de sodio 5% (5 mL) al balón de reacción, a 40°C durante 1

hora. Luego de haberse consumido el reactivo y el alcohol intermediario, observado por CCD, se removió la acetona por evaporación en vacío. El precipitado fue filtrado, lavado con agua fría y secado durante 12 horas en estufa de vacío (a 1mbar y 55°C) para dar **1** puro con un rendimiento de 78% (1,509 g, 7,2 mmol).

- Compuesto **2**, 4-(2,4-Diclorofenil)-5-nitro-butan-2-ona (adaptada del trabajo de Gorman¹³⁵). Se disolvieron 2,200 g de **1** (10,25 mmol), 3,133 g de nitrometano (51,25 mmol) y 3,754 g de dietilamina (51,25 mmol) en 230 mL de metanol. Se calentó durante 48 hs a reflujo. Luego de la desaparición del reactivo, observada por CCD, se enfrió la solución y se removió el metanol por evaporación en vacío. Se agregaron 100 mL de agua y 100 mL de diclorometano sobre el aceite obtenido, y se realizaron extracciones sucesivas con diclorometano (2 x 100 mL). Se juntaron los extractos orgánicos, se secó la solución con sulfato de sodio, se filtró y evaporó el diclorometano a presión reducida. Se realizó una purificación en columna, utilizando una mezcla 90:10 de ciclohexano:acetato de etilo, a partir de la cual se obtuvo **2** puro como un sólido blanco (88% rendimiento, 2,474 g, 9,02 mmol).
- Compuesto **3**, (Z)-N-[3-(2,4-Diclorofenil)-5-metil-2H-pirrol-2-yliden]-3,5-dimetil-1H-pirrol-2-amina (adaptada de los trabajos de Grossi y Wu^{125,126}). Una mezcla de **2** (1,500 g, 5,44 mmol), 2,4-dimetilpirrol (516 mg, 5,44 mmol) y acetato de amonio (14,6 g, 190 mmol) en metanol (32 mL) fue calentada durante 12 horas a reflujo. La reacción se hizo bajo atmósfera de N₂. La solución fue enfriada, tratada con solución saturada de bicarbonato de amonio (80 mL) y extraída con acetato de etilo (3 x 100 mL). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua y con solución saturada de cloruro de sodio, se secó el extracto orgánico resultante con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el acetato de etilo a presión reducida. El aceite obtenido contenía al menos 8 productos en concentración similar, detectables en CCD por iluminación con luz UV (254 nm). Se realizó una purificación en columna de sílica gel, usando como eluyente una mezcla de ciclohexano y acetato de etilo, variando la composición desde ciclohexano 95% y acetato de etilo 5%, hasta 100% de acetato de etilo. Por espectrometría de masa (ver sección 4.4. del presente capítulo), se pudo determinar que una de las fracciones, cuya masa fue de 100 mg, contenía al compuesto **3** y algunas impurezas. Dada la inestabilidad del compuesto, verificada por la desaparición de señal en una re-inyección en el espectrómetro de masa llevada a cabo una semana

después (en el medio se guardó el compuesto a -20°C bajo N_2), se repitió todo el procedimiento y la fracción de la columna que contenía al compuesto **3** se utilizó inmediatamente en el siguiente paso.

- **ABP-09** (aza-BODIPY: BF_2 coordinado a **3** mediante sus nitrógenos pirrólicos; tomada del trabajo de Wu¹²⁶). La fracción impura que contenía **3** (100 mg) se mezcló con DIPEA (504,1 mg, gran exceso) y $\text{BF}_3 \cdot \text{OC}_4\text{H}_{10}$ (780,3 mg, gran exceso) en diclorometano (20 mL) seco bajo N_2 durante 6 horas a temperatura ambiente. Se lavó la mezcla con agua (3 x 40 mL) y con solución saturada de cloruro de sodio (40 mL). El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el solvente bajo presión reducida. La purificación por placa preparativa dio una masa de producto ABP-09 muy baja (menos de 0,1 mg), como un sólido magenta.
- Compuesto **2a**, 4-(2,4-Diclorofenil)-2-metilpirrol (tomado del trabajo de Hall¹³⁶). Se agregó hidróxido de sodio (263 mg, 3,57 mmol) a una mezcla de **2** (200 mg, 0,75 mmol), THF (15 mL) y metanol (7,5 mL). Luego de 1 hora en agitación, la solución se agregó gota a gota sobre otra de ácido sulfúrico (4 mL) en metanol (20 mL) a 0°C . Posteriormente, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación durante 1 hora más. Se agregó a la solución 20 mL de agua líquida y 20 mL de hielo, y posteriormente se neutralizó la mezcla con hidróxido de sodio 4 M. Se realizó una extracción con diclorometano (2 x 20 mL), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (20 mL) y solución saturada de cloruro de sodio (20 mL). Se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y se removió el solvente bajo presión reducida. El aceite obtenido se trató con ácido acético (3,57 mL) y acetato de amonio (270 mg, 3,57 mmol), y posteriormente se calentó a 100°C durante 1 hora. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se le agregó hielo (20 mL). La solución resultante fue neutralizada con NaOH 4 M y se extrajo con diclorometano (2 x 20 mL). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua y solución saturada de cloruro de sodio (20 mL en cada caso), y se secó el extracto con sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el diclorometano y el aceite resultante fue purificado en columna de sílica gel. Se utilizó una mezcla de ciclohexano:acetato de etilo variando su composición desde 96:4 hasta 100% acetato de etilo. Se obtuvo **2a** como un sólido amarillo claro (83,1 mg, rendimiento 49%).

3.3. Espectroscopía RMN

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron adquiridos a través de los servicios que brinda la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos aplicados a la Química Orgánica (UMYMFOR) – Ciudad Universitaria, Pabellón I. El equipo utilizado fue el modelo *Bruker Avance II 500*. Los espectros protónicos y de carbono se midieron a 500 MHz y 126 MHz, respectivamente. Todas las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado (CDCl_3 , 99,96 % D, 0,03% v/v TMS, *Sigma Aldrich*).

3.4. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa

Los espectros de masa de alta resolución y los cromatogramas de UPLC fueron adquiridos en CIBION-CONICET, en el equipo *Waters ACQUITY UPLC I-Class system* acoplado a un espectrómetro de masa *Xevo G2-S QToF (Waters Corp., Manchester, UK)*. La utilización de este equipo se realizó bajo la supervisión de la Dra. María Eugenia Monge. Los solventes utilizados fueron agua MiliQ y acetonitrilo Optima LC/MS (*Fisher Chemical*). Las muestras fueron preparadas en mezclas de agua:acetonitrilo en proporciones 10:90. El gradiente utilizado en UPLC fue desde agua (0,5% ácido fórmico v/v):acetonitrilo 80:20 en condiciones iniciales, hasta 10:90 en 11 minutos. La velocidad del flujo en UPLC fue de 0,3 mL/min, la temperatura de la columna de 35°C y las condiciones de ionización variaron para los distintos compuestos. La purificación adicional de ABP-09 por HPLC se realizó en el equipo *ALLIANCE e2695* (módulo de separación) acoplado un detector de arreglo de diodo 2998 y un espectrómetro de masa de cuadrupolo simple *Waters SQ Detector 2 (Waters Corp., Manchester, UK)*. En el Apéndice I, junto a los espectros de masa obtenidos, se especifican los parámetros de ionización de cada determinación.

4. Experimentos en células

Los ensayos en células fueron llevados a cabo bajo la supervisión de la Dra. Susana Silberstein y en conjunto con la Lic. Natalia Armando, en las instalaciones del IBioBA-MPSP-CONICET. La mayor parte de los protocolos presentados en esta sección fueron optimizados en distintos momentos por la Dra. Carolina Inda y el Dr. Juan José Bonfiglio, y se utilizan en forma rutinaria en el laboratorio^{89,137}.

4.1. Líneas celulares

En esta tesis se trabajó con las siguientes líneas celulares:

- **HT22-CRHR1**: los clones estables de esta línea celular fueron generados durante la tesis de licenciatura del Dr. Juan José Bonfiglio¹³⁷. Son derivados de la línea HT22, un subclon de la línea HT4 que a su vez deriva de un cultivo primario de hipocampo de ratón y que fue cedida generosamente por el Dr. Dietmar Spengler (Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania). La línea HT22-CRHR1 expresa el receptor CRHR1 fusionado a un *tag* c-Myc en el N-terminal. Se decidió utilizar esta fusión dada la falta de anticuerpos comerciales que reconocieran de forma fiable el receptor¹⁰⁸. La funcionalidad del receptor fue verificada en el trabajo de tesis de licenciatura mencionado.
- **HT22-CRHR1-Epac-S^{H187}**: En su tesis de doctorado, la Dra. Carolina Inda generó esta línea celular estable la cual, además de expresar el c-Myc-CRHR1, expresa un biosensor de cAMP basado en FRET llamado Epac-S^{H187 89,138}. La proteína Epac (por *Exchange protein directly activated by cAMP*) es activada luego de la unión de cAMP y sufre un cambio conformacional. En el sensor, Epac se encuentra en medio de un sándwich entre un dador (mTurquoise2) y un aceptor (Venus) de FRET. Como se muestra en la Figura 2.6, tomada del trabajo de Klarenbeek¹³⁸, el cambio conformacional inducido por cAMP aleja al aceptor del dador y por lo tanto la eficiencia de FRET disminuye. Esta variación permite determinar por microscopía de fluorescencia el nivel de cAMP en células vivas con una gran sensibilidad.

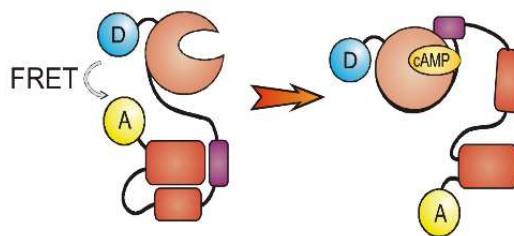


Figura 2.6. Representación esquemática de la variación de FRET en un sensor basado en Epac. Tomado del trabajo de Klarenbeek¹³⁸.

El mantenimiento de las líneas celulares en cultivo estuvo a cargo de la Lic. Armando. Se utilizó medio DMEM con baja glucosa (*Invitrogen*) suplementado con bicarbonato de sodio (2,4

g/L), HEPES (2,2 g/L), suero fetal bovino (5%) previamente deplementado por calor (65°C, 30 minutos), rojo fenol, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 mg/mL, glutamina 4 mM y geneticina 200 µg/mL. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y se mantuvieron en crecimiento con pasajes cada 72-96hs, diluyendo 1:20.

4.2. Visualización de la incorporación de ABP-09 en células vivas

La curva de emisión en función del tiempo de ABP-09 en células, que se presenta en la sección 2.4 del Capítulo 4, fue llevada a cabo en células HT22-CRHR1 vivas sembradas en pocillos con fondo de vidrio. El medio de cultivo utilizado fue DMEM sin rojo fenol (*Invitrogen*), para reducir la fluorescencia de fondo, suplementado con HEPES 20 mM y bicarbonato de sodio 2,4 g/L. Las células fueron crecidas a 37°C con 5% de CO₂, y la adquisición de imágenes se realizó en las condiciones que se describen a continuación.

Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de campo amplio *AxioObserver Z1* (*Zeiss*) instalado en el IBioBA-MPSP-CONICET. El mismo se encuentra equipado con una platina automática, una cámara de incubación para controlar la temperatura (37°C) y el nivel de CO₂ (5%) y un sistema *Definite Focus* (*Zeiss*) para conservar el foco a lo largo del experimento. La cámara del equipo es una *AxioCam HRm3*. El programa utilizado para controlar el microscopio es *ZEN Black 2011* (*Zeiss*).

En todas las determinaciones se utilizó un objetivo de aire *Plan-Achromat* 20x de 0,8 AN. Por otro lado, la excitación fue realizada con un LED de 505 nm a un 15% de su potencia. Se usó un cubo de fluorescencia triple *60HE* (*Zeiss*), que cuenta con un filtro de excitación *BP 445/25-510/15-588/27* (*HE*), un dicroico *DFT 460+520+605* (*HE*) y un filtro de emisión *TBP 480+546+LP615* (*HE*). Se adquirieron imágenes de 1040 x 1388 píxeles, 14 bit, cada 10 minutos con 750 ms de tiempo de exposición.

Se trataron tres pocillos con ABP-09 en una concentración final de 10 nM, otros tres en 100 nM y otros fueron utilizados como control (autofluorescencia). Las células presentaban un 60% de confluencia. Se analizaron tres campos para cada pocillo, cada uno de los cuales incluía entre 10 y 20 células.

El análisis de imágenes se llevó a cabo a través de una rutina de *Matlab*. Se fijó un valor límite de intensidad para diferenciar la emisión proveniente de ABP-09 de la señal de fondo. Este límite se modificó en función del tiempo, siguiendo la variación de la señal de fondo. Para cada tiempo y campo analizado, se tomó el promedio de las intensidades por encima del límite y se le

restó el promedio de los valores por debajo del mismo. Finalmente, se promediaron todos los campos correspondientes al mismo tiempo y concentración de ABP-09. Los datos se presentan en la Figura 4.16 (Capítulo 4).

4.3. Medición de cAMP generado por activación de CRHR1 a través de biosensor de FRET

La adquisición de imágenes de células que expresan el biosensor de cAMP basado en FRET se realizaron en un microscopio confocal invertido *LSM 710 (Zeiss)* instalado en el IBioBA-MPSP-CONICET. Este experimento se realizó en células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} vivas.

Al igual que el microscopio de campo amplio, el *LSM 710* se encuentra equipado con una platina automática, una cámara de incubación para controlar la temperatura y el nivel de CO₂, y un sistema *Definite Focus (Zeiss)* para conservar el foco. El programa utilizado para controlar el microscopio fue *ZEN Black 2011 (Zeiss)*. En todas las mediciones se utilizó un objetivo de inmersión de agua 40x con corrección de temperatura (*C-Apochromat NA 1.2*).

Las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} fueron sembradas en pocillos con fondo de vidrio. El volumen de líquido utilizado fue 250 µL. Al igual que en el experimento descrito en la sección 4.2., el medio de cultivo usado fue DMEM sin rojo fenol suplementado con HEPES 20 mM y bicarbonato de sodio 2,4 g/L, y las muestras fueron crecidas y analizadas a 37°C con 5% de CO₂.

El tratamiento con ABP-09, CP-376395 (*Tocris Bioscience*, antagonista comercial, ver Capítulo 4) o vehículo se realizó 20 horas antes de agregar el estímulo de CRH. Las concentraciones de ABP-09 y CP-376395 en los 250 µL finales fueron de 10 nM y 100 nM. Tanto ABP-09 como CP-376395 se almacenaron en alícuotas de concentración 100 µM en DMSO, por lo que la dilución de DMSO en los pocillos fue de 1:1.000 y 1:10.000, respectivamente. El vehículo usado en las muestras control consistió en una dilución de DMSO en medio de cultivo que diera lugar a la mayor de esas concentraciones. Finalmente, la estimulación de las células se realizó con el agregado de CRH 10 nM 2,5 minutos después de haber empezado la adquisición de imágenes. Se utilizó CRH humano/rata (*Bachem Biochemica*) en una concentración 10 nM, ya que en esa condición se pueden medir los efectos de activación del receptor por esta técnica⁹⁸. Vale remarcar que las secuencias de CRH de ratón, humano y rata son idénticas.

La excitación del dador, mTurquoise2, se realizó con un diodo láser de 405 nm de 30 mW a 2% de potencia. La emisión fue detectada entre 413 y 723 nm cada 15 segundos, con una ganancia de 650 y utilizando el detector *QUASAR* de 32 canales con un ancho de banda por canal de 9,7 nm. Se adquirieron fotografías de 1024 x 1024 píxeles, 16 bit, tiempo de escaneo por píxel

3,15 μs y *pinhole* abierto (600 μm). En cada imagen se verificó que no hubiera saturación de la señal. Las condiciones de excitación y adquisición se mantuvieron invariables para todas las determinaciones.

Los espectros de emisión mTurquoise2 y Venus fueron medidos experimentalmente y cargados al programa por otros usuarios⁸⁹. El de ABP-09 fue determinado en una muestra de células HT22-CRHR1 a una concentración final de 1 μM . Las condiciones de excitación y adquisición fueron las mismas que las descritas para los experimentos de FRET. En la Figura 2.7 se muestra una captura de pantalla del programa donde se pueden ver las células tratadas con ABP-09 1 μM y el espectro de emisión medido en una región celular. Una vez adquirido, el espectro fue cargado en el programa para posteriormente poder discernir en los experimentos de FRET la emisión proveniente de cada uno de los tres fluoróforos presentes en la muestra (ver más abajo).

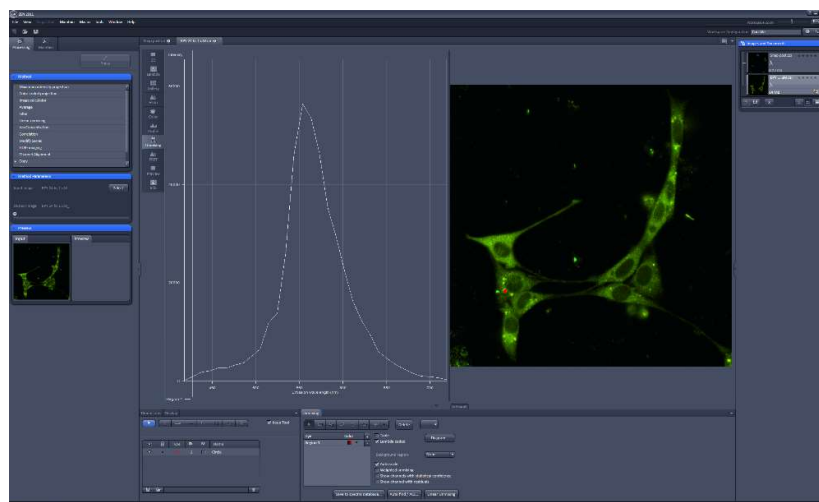


Figura 2.7. Captura de pantalla del programa *ZEN Black 2011* donde se pueden ver células HT22-CRHR1 tratadas con ABP-09 1 μM (derecha) y el espectro de ABP-09 medido dentro de una célula (izquierda). El punto rojo en la célula señala la región a partir de la cual se obtuvo el espectro.

La función *Linear Unmixing* permitió realizar la deconvolución espectral de las muestras donde se evaluó la variación de FRET. Para ello, el programa tiene en cuenta los espectros de los tres fluoróforos: mTurquoise2, Venus y ABP-09. En general, es esperable que señal debida a ABP-09 sea baja en todas las muestras por dos motivos: (i) la baja probabilidad de excitación directa de ABP-09 a 405 nm (ver Figura 2.4) y (ii) la dificultad de que ocurra transferencia de energía desde mTurquoise2 hacia ABP-09 a concentraciones tan bajas de este último (la distancia promedio entre ABP-09 y mTurquoise2 es mayor a las distancias típicas de FRET).

En la Figura 2.8 se muestra a modo de ejemplo la deconvolución espectral realizada sobre una muestra control. La misma recibió estímulo de CRH y no fue tratada con ABP-09 (únicamente se trató con vehículo: medio y DMSO en dilución 1:1.000). Por tal motivo, los únicos fluoróforos presentes fueron mTurquoise2 y Venus. La parte izquierda corresponde a un cuadro anterior al agregado de CRH, mientras que la columna derecha representa el cuadro posterior a la estimulación. Se puede apreciar una disminución de FRET, expresada en una merma de la intensidad del canal de Venus (amarillo) y un aumento en el canal de mTurquoise2 (cian). En el canal de ABP-09 no se observa fluorescencia, como es de esperar para una muestra control.

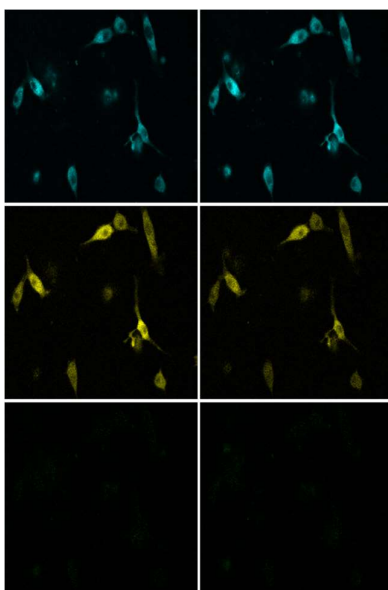


Figura 2.8. Imágenes correspondientes a los canales mTurquoise2 (cian), Venus (amarillo) y ABP-09 (el tercer canal; no se ve fluorescencia y por lo tanto aparece sólo en negro) de una muestra control. La columna izquierda corresponde al cuadro anterior al estímulo con CRH, mientras que la derecha es el cuadro posterior al agregado del ligando.

Las imágenes fueron analizadas con *Fiji-ImageJ* siguiendo el protocolo desarrollado por Inda⁸⁹. Se sustrajo la señal de fondo y posteriormente se midió a nivel de célula única la intensidad del dador y el aceptor de FRET. El cociente de dador/FRET (donde FRET representa el canal de Venus) fue calculado y normalizado a los niveles basales (previos al estímulo) para cada célula.

4.4. Medición de la activación de ERK1/2 y Akt a través de *Western blot*

Los incrementos de ERK1/2 y Akt debidos a la activación del receptor con CRH se midieron mediante la técnica de *Western blot*. En estos experimentos, las células fueron tratadas con ABP-09 (o vehículo) y hambreadas de suero en medio OptiMEM 20 horas antes del estímulo con CRH. Se trabajó con concentraciones de ABP-09 de 100 nM y 1 μ M. Para evitar concentraciones de DMSO mayores a 1:1.000, se preparó una solución madre de ABP-09 1 mM.

Cada condición (vehículo, ABP-09 100 nM y 1 μ M) abarcó tres pocillos de células: uno para la condición basal (sin estímulo) y los otros dos para ser estimulados por 5 y 30 minutos. La finalización del estímulo se realizó colocando la placa en hielo y lavando las células con PBS frío. Las células fueron lisadas en *Laemmli buffer* 2x (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% m/v SDS, 10% glicerol y 5% v/v β -mercaptoetanol), sonicadas en un sonicador *Bioruptor* (*Next Gen Diagenode*). Los lisados fueron calentados a 95°C por 5 minutos antes de ser sembrados en geles de poliacrilamida.

Las muestras fueron resueltas por *SDS-PAGE*. Para ello, se utilizaron geles de poliacrilamida 12% en *buffer* Tris-Glicina-SDS (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 0,1% SDS) durante aproximadamente una hora y media a 150 V. Como marcador de masa relativa se utilizó el *Broad Precision Marker* (*Biorad*). Una vez finalizada la corrida, las proteínas del gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con poros de 0,45 μ m a 100 V durante 1 hora en un *buffer* conteniendo Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y 20% metanol. Luego, se tiñeron reversiblemente las proteínas con rojo Ponceau para corroborar la transferencia y evaluar en forma cualitativa la masa sembrada en cada calle. Se incubaron las membranas durante una hora en agitación con *TBS-Tween* 0,05% (Tris 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%) con 5% m/v de leche descremada (previamente inactivada a 60°C por una hora) para bloquear los sitios de unión inespecíficos. La inactivación se realiza debido a que se quieren ver proteínas fosforiladas y la leche contiene fosfatasas que podrían interferir en la determinación.

Finalmente, se incubaron las membranas con anticuerpos primarios en agitación durante la noche a 4°C. Los anticuerpos se diluyeron en BSA 5% en *TBS-Tween* 20 0,05%. Para el estudio de ERK1/2, se incubó con anti-fosfo-ERK1/2 (ratón, *E-4, sc-7383, Santa Cruz Biotechnology*) y anti-total-ERK1/2 (conejo, *9102, Cell Signaling*). En el caso de Akt se utilizó anti-fosfo-Akt (conejo, 4058, *Cell Signaling*) y anti-total-Akt (ratón, 2920, *Cell Signaling*). Luego de la incubación con anticuerpos primarios, las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con *TBS-Tween* 20 0,05%. Posteriormente, se trataron con anticuerpos secundarios acoplados a los fluoróforos IRDye700DX (anti-conejo para ver ERK1/2 total y anti-ratón para visualizar Akt total, *Li-Cor Biosystems*) o IRDye800DX (anti-ratón para p-ERK1/2 y anti-conejo para p-Akt, *Li-Cor Biosystems*) diluidos 1:10.000 en *buffer* de bloqueo (*Li-Cor Biosystems*) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Luego de tres lavados con *TBS-Tween* 0,05% y uno con *TBS*, se realizó la detección por fluorescencia en el equipo *Odyssey Fc Imaging System* (*Li-Cor Biosystems*).

4.5. Inmunomarcación de CRHR1 y marcación con ABP-09. Preparación de muestras para STORM

Los cubreobjetos de 18 mm utilizados para las muestras de STORM fueron tratados según el protocolo de la sección 2.3. Se sembraron células HT22-CRHR1 en estos vidrios hasta una confluencia de 60%. Luego de 20 horas de incubación con ABP-09 en DMEM sin rojo fenol, las células fueron lavadas con PBS frío suplementado con MgCl_2 1 M y CaCl_2 1 M y fijadas con paraformaldehído 4% en PBS durante 15 minutos. Luego, las células fueron permeabilizadas con 0,01% Triton X-100 en PBS durante 15 minutos. Luego de lavar con PBS suplementado, se redujo la posibilidad de unión inespecífica bloqueando con FBS 5% en PBS durante 1 hora. Se agregó anticuerpo primario anti-c-Myc (ratón, 9E10, sc-40 Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:150 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara humidificada. Luego de lavar con Tween 20 0,05% en PBS, las células fueron incubadas con AlexaFluor647 conjugado a anticuerpos secundarios anti-ratón (A-21235, Thermo Fisher Scientific) diluidos 1:250 por una hora, a temperatura ambiente, en cámara humidificada y en ausencia de luz. Los controles realizados fueron: (i) autofluorescencia de las células sin utilizar ningún anticuerpo, (ii) marca inespecífica del anticuerpo secundario, donde no se colocó anticuerpo primario, pero sí secundario y (iii) reconocimiento inespecífico del anticuerpo primario, para el cual se usó la línea parental HT22 que carece del *tag* de c-Myc. Todos los controles dieron resultados satisfactorios.

Luego de lavar con Tween 20 0,05% en PBS, los cubreobjetos se mantuvieron en PBS frío suplementado con MgCl_2 y CaCl_2 . Antes de ver las muestras en el nanoscopio de STORM, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos especiales que presentan un cuenco en el que se colocaron 100 μL *buffer* de *imaging* de STORM (Tris 50 mM, pH=8, NaCl 10 mM, suplementado con 10% m/v glucosa, mercaptoetilamina (MEA) 100 mM, 1 $\mu\text{g/mL}$ glucosa oxidasa y 0,5 $\mu\text{g/mL}$ catalasa). Finalmente, los preparados se sellaron con esmalte y se observó la muestra pocos minutos después.

5. Métodos computacionales

5.1. Cálculos mecano-cuánticos de derivados de 3-hidroxicromona

Los cálculos fueron realizados por la Dra. Verónica Sánchez en el Centro de Simulación Computacional para Aplicaciones Tecnológicas, CSC-CONICET. El programa utilizado fue *Gaussian 09*¹³⁹. Las geometrías fueron optimizadas usando DFT (*Density Functional Theory*), en combinación con el híbrido funcional CAM-B3LYP¹⁴⁰ y TZVP, tal como se hizo en otros trabajos¹⁴¹. Los confórmeros N y T de los compuestos **1-3** (ver Capítulo 3) fueron optimizados en presencia de solvente continuo (diclorometano) utilizando un modelo polarizado continuo (PCM)^{142,143}. Las

energías de absorción se determinaron utilizando TDDFT en combinación con iteración externa¹⁴⁴-PCM para considerar el entorno del solvente en la transición. Los momentos dipolares de las transiciones también fueron calculados.

5.2. Estudios de *docking*

Esta parte del trabajo fue llevada a cabo por el Dr. Claudio Cavasotto en el Laboratorio de Química Computacional y Diseño de Drogas, del IBioBA-MPSP-CONICET. A continuación, se presentan las condiciones y los métodos que utilizó en la realización de estos estudios.

Los estudios de *docking* se realizaron con el programa *Internal Coordinates Mechanics (ICM)*^{145,146} y fueron basados en la estructura cristalina del GPCR de clase B CRHR1¹⁰⁷. El sistema molecular fue descripto usando el campo de fuerzas ECEPP/3¹⁴⁷ y preparado de forma análoga a trabajos previos del Dr. Cavasotto^{148,149}. Sucintamente, las cargas de ligando fueron asignadas empleando el campo de fuerza MMFF¹⁵⁰⁻¹⁵⁴ y se agregaron átomos de hidrógeno a la estructura del receptor, seguido por una minimización local de la energía en el espacio torsional. Se asignaron cargas -1 a las cadenas laterales de los aminoácidos Asp y Glu, y +1 a las cadenas de Arg y Lys. Los tautómeros de His se seleccionaron en función del patrón de uniones de hidrógeno.

El *docking* se realizó en el sitio de unión alostérico luego de eliminar todas las moléculas de agua y cofactores presentes en la estructura cristalina. Se utilizó la aproximación ligando-flexible—receptor-rígido implementada en ICM. El receptor fue representado por mapas de energía correspondientes a interacciones electrostáticas, de puente hidrógeno, hidrofóbicas y de Van der Waals (esta última representada por seis mapas diferentes). En el algoritmo de *docking*, los grados de libertad torsionales (DOF) de las pequeñas moléculas y sus seis coordenadas rígidas fueron considerados flexibles en el campo de energía del receptor rígido y sometidos a una minimización global de energía por un método de Monte Carlo, minimizando así las energías intra- e intermoleculares. Se calculó un puntaje de *docking* empírico para la pose de menor energía de cada ligando, teniendo en cuenta su ajuste al sitio de unión¹⁵⁵. Para mejorar la convergencia del paso de minimización global de energía, el *docking* fue realizado por duplicado. Las estructuras resultantes fueron refinadas en una forma guiada por ligando¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Capítulo 3: Dinámica del proceso ESIPT en derivados de 3-HC en función de la temperatura y su patrón de sustitución

1. Introducción

Los derivados de la 3-hidroxicromona (3-HC) presentan una reacción de transferencia de protón en estado excitado, conocida como ESIPT (por sus siglas en inglés), dando lugar a dos estados excitados que emiten fluorescencia: la forma normal (N^*) y el tautómero (T^*). La transferencia es impulsada por un aumento en la acidez del grupo dador de protón (3-hidroxilo) y en la basicidad del grupo aceptor (4-carbonilo), debido a la redistribución de densidad electrónica en el estado excitado⁷⁰.

Los espectros de emisión de ambas especies suelen encontrarse suficientemente separados en energía como para ser resueltos, y a su vez presentan un corrimiento de Stokes apreciable, siendo mayor el de la banda T^* ($>6.000\text{ cm}^{-1}$). Por otro lado, la relación de intensidades de emisión I_{N^*}/I_{T^*} está determinada en gran medida por distintas propiedades del entorno, como la polaridad, basicidad y temperatura. Por tal motivo, esta familia de fluoróforos es utilizada en microscopía y espectroscopía de fluorescencia como sensores de entornos microheterogéneos⁷⁴⁻⁷⁶. La reacción fue introducida por Kasha⁷³ en 1979 y recientemente se realizaron distintas revisiones sobre las propiedades fluorescentes de estas sondas y las dinámicas del proceso ESIPT^{70,78,159}. Conocer los fundamentos que rigen el proceso ESIPT y cómo las propiedades de los sustituyentes y del entorno lo modulan es de gran interés, ya que permite optimizar el diseño dirigido de sondas con características deseadas.

Al analizar los escenarios cinéticos posibles, se pueden pensar dos extremos: (1) un rápido establecimiento del equilibrio entre N^* y T^* , en un tiempo mucho menor al de la desactivación de ambas especies (control termodinámico); (2) la ausencia de una reacción reversa desde T^* para dar N^* durante la escala de tiempo en la que ocurre la desactivación de ambas especies (control cinético)⁷⁰. Ambos extremos presentan comportamientos distinguibles en su emisión estacionaria y resuelta en el tiempo. En la Figura 3.1 se presentan en forma esquemática ambos mecanismos. Un caso intermedio también es posible, donde la interconversión entre N^* y T^* ocurre a una velocidad comparable a la desactivación de ambas especies excitadas.

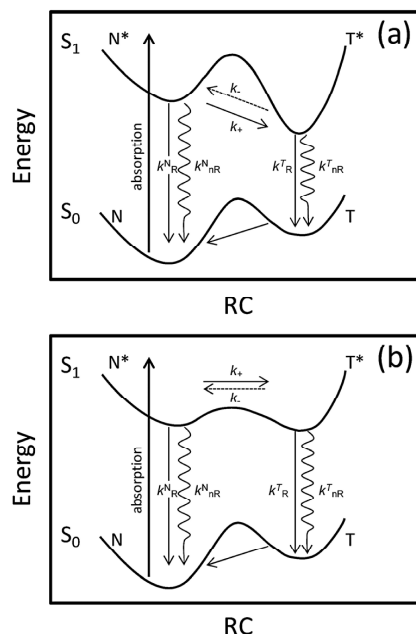


Figura 3.1. Esquemas cinéticos extremos del proceso ESIPT. Se grafica la energía en función de la coordenada de reacción. (a) Caso de control cinético, $k_c + k_+ \approx (k_R^N + k_{nR}^N + k_R^T + k_{nR}^T)$. (b) Caso de control termodinámico, $k_c + k_+ \gg (k_R^N + k_{nR}^N + k_R^T + k_{nR}^T)$. Figura tomada del trabajo de Tomin¹⁶⁰.

Un derivado de 3-HC ampliamente estudiado es la 3-hidroxiflavona, 3-HF^{82,160,161}. Mediciones de espectroscopía ultra-rápida demostraron que la reacción ESIPT en 3-HF ocurre en el orden de los femtosegundos en solventes no polares, secos y extremadamente puros^{70,82,162}. En este compuesto, el equilibrio tautomérico en estado excitado se encuentra desplazado hacia T* y no se observa emisión estacionaria desde N*, salvo en los casos de solventes próticos o algunos polares no-próticos^{80,160}. Por otro lado, la sustitución en el grupo fenilo de 3-HF, como es el caso de 4-*N,N*-dietilamino-3-HF (DEAHF), y la introducción de sustituyentes aromáticos distintos al fenilo en la posición 2 de 3-HC, como en la 2-benzofuril-3-hidroxicromona (BF-3HC), también fueron estudiadas^{80,160,163–165}. En la Figura 3.2 se presentan las estructuras de BF-3HC y DEAHF.

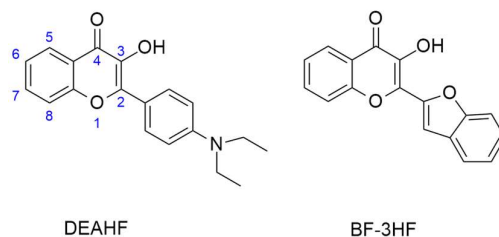


Figura 3.2. Estructuras de DEAHF y BF-3HC.

La presencia de grupos dadores de electrones en DEAHF modulan fuertemente las propiedades espectroscópicas y el proceso ESIPT⁸⁰. Esto se debe principalmente a la generación de un estado de transferencia de carga intramolecular en el estado excitado (ESICT, por sus siglas en inglés). En el estado ESICT la 3-hidroxicromona actúa como aceptor de carga a través del 4-carbonilo, mientras que el sustituyente aromático en posición 2 actúa como dador de densidad

electrónica. La presencia del sustituyente *N,N*-dietilaminofenilo en DEAHF incrementa el carácter de transferencia de carga en estado excitado por ser un buen dador de electrones. La separación de cargas producida por el proceso ESICT le otorga un elevado momento dipolar al estado excitado, por lo que presenta fuertes interacciones con solventes polares. Este proceso tiene una consecuencia directa sobre la emisión: en solventes polares, el estado electrónico excitado se estabiliza en mayor proporción que el fundamental y como consecuencia la banda de emisión se desplaza a mayores longitudes de onda. El efecto sobre la absorción es menor, ya que los estados Franck Condon de S_1 siguen siendo de similar energía. Este fenómeno es conocido como solvatocromismo positivo^{70,80,166,167}. La presencia de solvatocromismo positivo en la banda N^* en DEAHF permite concluir que el estado ESICT tiene lugar en la forma N^* y no en la T^* . El incremento de I_{N^*}/I_{T^*} con la polaridad del solvente observado en DEAHF es consistente con una mayor estabilización de N^* por interacciones dipolares con el medio.

En la Figura 3.3 se presenta en forma esquemática el proceso ESICT acoplado al ESIPT para DEAHF, tomado del trabajo de Demchenko⁷⁰. El estado CT^* se refiere a la forma normal en estado excitado, que presenta transferencia de carga (CT , por *charge transfer*). Por su parte, PCT^* hace referencia a la forma T^* como un estado acoplado de transferencia de carga y protón. El momento dipolar de PCT^* es similar al de la forma N en estado fundamental, siendo ambos menores al de CT^* . Por simplicidad, no se presenta en el esquema el estado fundamental T .

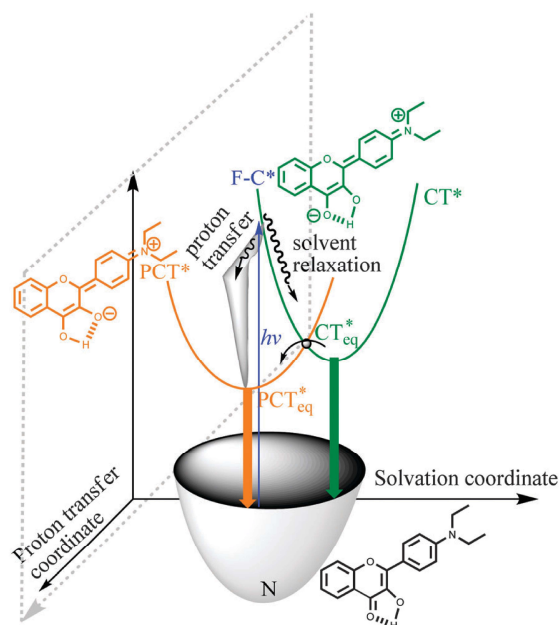


Figura 3.3. Generación de un estado de transferencia de carga en estado excitado (ESICT) y su acoplamiento a un proceso de transferencia de protón en estado excitado, ESIPT. Figura tomada del trabajo de Demchenko⁷⁰.

A partir de estas observaciones, se puede ver que modulando el acoplamiento de los procesos de transferencia de carga y de protón en estado excitado es posible controlar la relación

de intensidades I_{N^*}/I_{T^*} , así como también las posiciones de los máximos de emisión y los tiempos del proceso ESIPT. Hasta el momento de escritura de esta tesis, la mayoría de las sustituciones estudiadas corresponden a modificaciones sobre el anillo B de la 3-HC (ver Figura 1.14, Capítulo 1). En estos compuestos, la excitación se da siempre desde la forma N en estado fundamental, siendo N* la única fuente de T*. Sustituciones en el anillo A de la 3-HC han sido exploradas con menor profundidad y de manera más dispersa. En particular, se pueden mencionar los siguientes estudios:

- 1) Giordano mostró que la presencia de un grupo 4-*N,N*-dimetilaminofenilo en la posición 7 del anillo A de la 3HC -sin sustituyentes en posición 2- da lugar a una modificación del momento dipolar de N* en comparación con los derivados de 3-HF. Esta reorientación del momento dipolar estabiliza fuertemente la forma N* e inhibe por lo tanto el proceso ESIPT⁸⁵.
- 2) Klymchenko demostró en 2003 que un grupo metoxilo en la posición 7 de DEAHF contrarresta parcialmente el efecto generado por el grupo *N,N*-dietilaminofenilo en el proceso ESICT. Esto se explica a partir de la capacidad del grupo metoxilo como dador de densidad electrónica, que convierte al motivo 3-HC en un peor aceptor de electrones. Por lo tanto, el solvatocromismo positivo y el incremento de I_{N^*}/I_{T^*} con la polaridad del solvente del 7-metoxi-DEAHF es menor a la de DEAHF⁸⁰. M'Baye observó un efecto similar al agregar un metoxilo en posición 7 a una 2-(2-tienil)-3-HC⁸⁴.
- 3) Klymchenko en 2007 volvió a verificar el efecto de un dador de electrones en la posición 7 de DEAHF. En este caso el dador utilizado fue un derivado de la tiourea, que da lugar a un menor carácter de transferencia de carga a N* y a un desplazamiento del equilibrio tautomérico hacia T* en comparación DEAHF. A su vez mostró que un grupo aceptor de electrones (isotiocianato) en la misma posición estabiliza el estado de transferencia de carga y la relación I_{N^*}/I_{T^*} es mayor que para DEAHF⁸⁴.

En el presente capítulo se describe la caracterización de tres derivados de la 3-HC que presentan sustituyentes dadores o aceptores de electrones en las posiciones 7 y 2. La síntesis de los mismos fue realizada por la Dra. Luciana Giordano¹³³. Las estructuras se presentan en la Figura 3.4. Se puede ver que el compuesto **1** posee dadores de electrones en las posiciones 7 (4-*N,N*-dimetilaminofenilo) y 2 (4-*N,N*-dietilaminofenilo), el **2** cuenta con un grupo dador de electrones en posición 7 (4-*N,N*-dimetilaminofenilo) y un aceptor moderado en posición 2 (2-tienilo), mientras que el compuesto **3** presenta un aceptor moderado en posición 7 (2-tienilo) y un dador en posición 2 (4-*N,N*-dietilaminofenilo). Los compuestos poseen rendimientos cuánticos de

fluorescencia típicos para derivados de 3-HC con sustituyentes aromáticos en 2 o 7: para **1** vale 0,43 en tolueno, 0,40 en diclorometano y 0,34 en acetonitrilo; para **2** 0,46, 0,32 y 0,01 en los mismos solventes; y finalmente para **3** 0,40, 0,50 y 0,35. Además de las propiedades de emisión estacionaria en distintos solventes, se presentan estudios de anisotropía de fluorescencia y de fluorescencia resuelta en el tiempo. Por otro lado, también se aborda la dependencia del equilibrio ESIPT con la temperatura para los tres casos con el objetivo de conocer las energías de activación de los pasos directos e inverso del proceso ESIPT, así como también las diferencias de energía de los tautómeros en estado excitado¹.

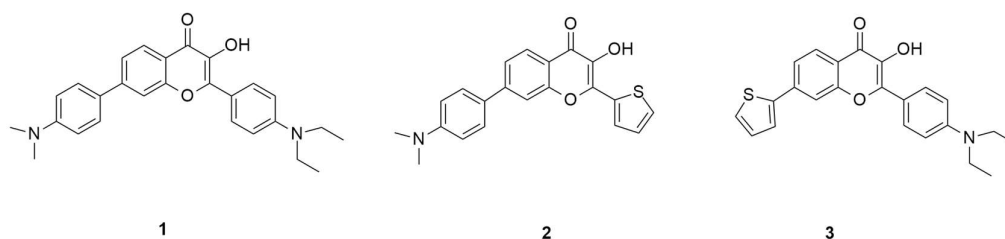


Figura 3.4. Estructuras de los compuestos 1 a 3.

2. Resultados y discusión

2.1. Emisión estacionaria

En la Figura 3.5 se presentan los espectros de excitación y de emisión estacionaria para los compuestos **1** a **3** en diclorometano (DCM) a 15°C. Allí puede apreciarse la emisión dual característica de los derivados de 3-HC. En los casos de los compuestos **1** y **3** las bandas N* y T* se distinguen con claridad, mientras que en el compuesto **2** las mismas presentan un solapamiento apreciable. Para obtener las posiciones de los máximos y la intensidad de cada banda con precisión se realizaron deconvoluciones espectrales utilizando funciones gaussianas (el proceso se explica más abajo).

¹ Como se trabaja a presión constante, estas diferencias son de entalpía. Sin embargo, por ser fases condensadas, la diferencia entre energía interna y entalpía es despreciable y hablaremos de energía en lo que sigue.

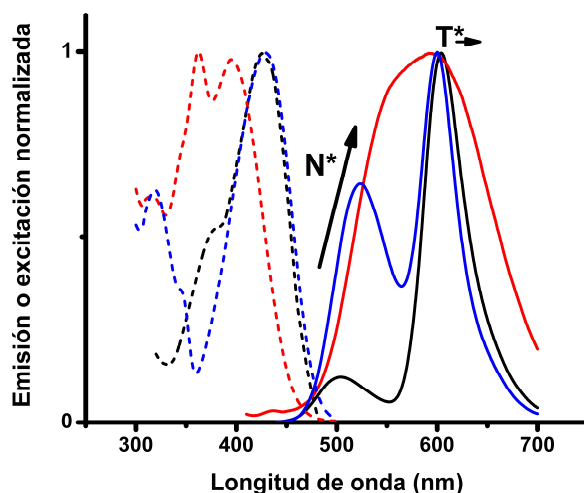


Figura 3.5. Espectros de excitación (línea punteada) y de emisión (línea sólida) estacionarias corregidos de los compuestos **1** (línea negra; $\lambda_{\text{exc}}=425$ nm en espectro de emisión; $\lambda_{\text{em}}=610$ nm en espectro de excitación), **2** (línea roja; $\lambda_{\text{exc}}=400$ nm en espectro de emisión; $\lambda_{\text{em}}=600$ nm en espectro de excitación) y **3** (línea azul; $\lambda_{\text{exc}}=430$ nm en espectro de emisión; $\lambda_{\text{em}}=600$ nm en espectro de excitación).

Al comparar la emisión de los compuestos **1** y **3**, se puede ver que la presencia de un dador de electrones en la posición 7 del compuesto **1** disminuye la proporción de la banda N^* . Esta observación es consistente con la disminución de I_{N^*}/I_{T^*} informada para 7-metoxi-3-DEAHF en comparación con DEAHF⁸⁰. Por otro lado, se puede apreciar que la presencia de un aceptor de electrones en posición 7 ejerce una fuerte influencia en el proceso ESIPT, ya que el compuesto **2** es el que mayor intensidad relativa de N^* posee. La variación de I_{N^*}/I_{T^*} observada entre los tres compuestos se relaciona con el carácter ESICT que presenta N^* : en **1** el grupo dador de electrones en 7 empeora la capacidad del 4-carbonilo de actuar como aceptor de carga, mientras que en **3** el grupo aceptor de electrones en la misma posición exagera el carácter de transferencia de carga. Tanto **2** como **3** presentan un comportamiento conocido como *push-pull*, en el cual se favorece el proceso ESICT gracias a la presencia dentro de la misma molécula de un grupo dador de electrones y de otro aceptor, siendo este fenómeno más eficiente en **2** que en **3**. Este resultado se condice con la inhibición del proceso ESIPT observada por Giordano en una 3-HC con la misma sustitución en el anillo A que **2**⁸⁵.

Un análisis de los espectros de excitación permite afirmar que la absorción se encuentra gobernada por la sustitución en el anillo B, ya que **1** y **3** presentan espectros muy similares entre sí, mientras que el de **2** es parecido al de 2-(2-furil)-3-hidroxicromona (FHC) y de 2-(2-tienilo)-3-hidroxicromona (THC), que presentan una sustitución en el anillo B análoga a la de **2**^{168,169}. A su vez, los espectros de **1** y **3** se encuentran 20-30 nm desplazados hacia el rojo en comparación con

DEAHF y lo mismo ocurre con **2** al contrastarlo con THC y FHC. Estos corrimientos se deben a la extensión de la conjugación presente en **1-3** al poseer sustituyentes en la posición 7 de la 3-HC.

El proceso de deconvolución espectral se realizó para todos los espectros de emisión obtenidos trabajando en el dominio de la frecuencia (número de onda). En particular, la banda N* se ajustó a través de una función gaussiana, mientras que la banda T* se aproximó por la suma de dos gaussianas: T_1^* y T_2^* , correspondiendo la de menor amplitud a un sobretono vibracional. En todos los casos, el sobretono se encontró a menores energías. Únicamente para **2** en DCM se realizó un ajuste de T* con una sola gaussiana. En la Figura 3.6 se presenta a modo de ejemplo la deconvolución del espectro de emisión de **3** en DCM a 25°C. Por otro lado, en el Apéndice II se muestran ejemplos de deconvolución de los compuestos **1** y **2**.

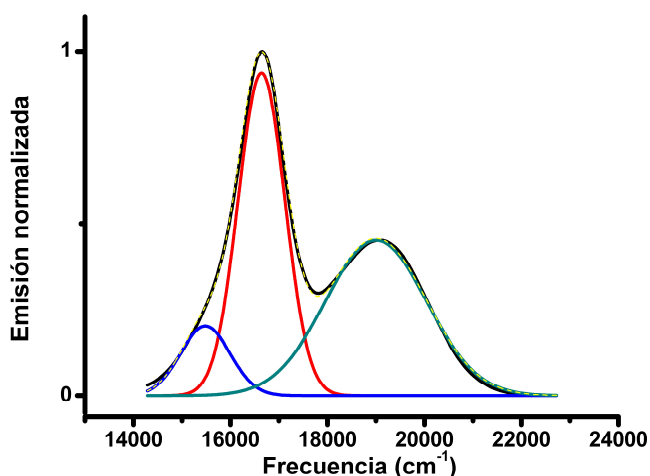


Figura 3.6. Deconvolución espectral de la emisión de **3** en DCM a 25°C. En rojo y azul se muestran las gaussianas que ajustan T_1^* y T_2^* , mientras que en verde se presenta la gaussiana que mejor aproxima N*. La curva negra corresponde al espectro obtenido experimentalmente y la línea punteada amarilla a la suma de las tres componentes gaussianas.

2.1.1. Influencia del solvente

En la Figura 3.7 se pueden observar los espectros estacionarios de excitación y de emisión para el compuesto **1** a 15°C en tolueno, diclorometano y acetonitrilo. Allí se puede ver que la banda N* presenta un fuerte solvatocromismo positivo: la posición de su máximo vale 476 nm en tolueno, 509 nm en diclorometano y 535 nm en acetonitrilo. Por su parte, el espectro de excitación y la emisión correspondiente a la banda T* presentan variaciones mínimas en la posición de sus máximos. Este comportamiento coincide con el observado para DEAHF y otras 3-HF^{70,80}, y puede explicarse a partir de la separación de carga presente en N*: el alto momento dipolar le otorga una mayor estabilidad en los solventes polares, disminuyendo por lo tanto la energía del fotón

emitido. El crecimiento de I_{N^*}/I_{T^*} al aumentar la polaridad del medio es consecuencia del mismo fenómeno. Por su parte, T^* no presenta una separación de carga apreciable y por tal motivo su solvatocromismo es menor al de N^* . En la Tabla 3.1 se muestran los corrimientos para los compuestos **1-3** en los tres solventes, a 15°C y 45°C. Allí se puede ver que la susceptibilidad solvatocrómica es mayor para **2** que para los demás compuestos. La dependencia con la temperatura se analiza en el siguiente inciso.

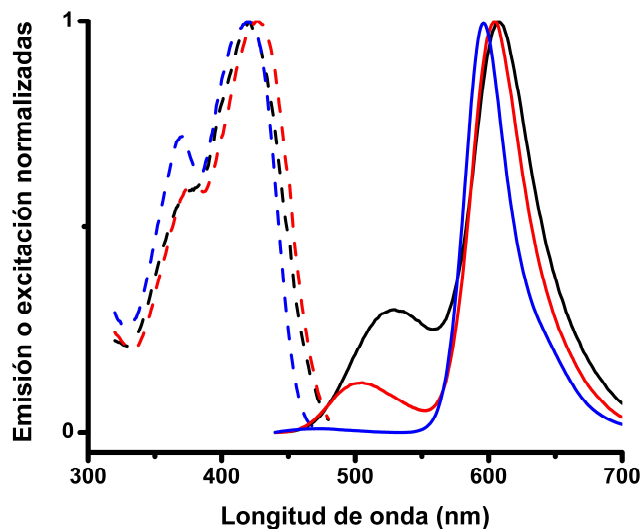


Figura 3.7. Espectros de excitación y de emisión corregidos de **1** en tolueno (azul), diclorometano (rojo) y acetonitrilo (negro) a 15°C. Condiciones de adquisición: $\lambda_{exc}=425$ nm en espectro de emisión; $\lambda_{em}=610$ nm en espectro de excitación.

		15°C			45°C		
		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)					
		ACN	DCM	TOL	ACN	DCM	TOL
1							
N*	535	509	476	531	504	472	
T ₁ *	609	603	596	606	600	593	
T ₂ *	654	625	620	644	621	618	
2							
N*	544	562	479	542	545	472	
T*	-	629	-	-	617	-	
T ₁ *	592	-	580	590	-	578	
T ₂ *	647	-	608	643	-	606	
3							
N*	552	528	495	549	522	491	
T ₁ *	607	601	597	606	600	596	
T ₂ *	658	648	621	658	643	619	

Tabla 3.1. Posiciones de los máximos de N*, T₁* y T₂* para acetonitrilo (ACN), diclorometano (DCM) y tolueno (TOL), a 15 y 45°C.

2.1.2. Influencia de la temperatura

La dependencia de la emisión estacionaria con la temperatura se estudió en el intervalo de -70 a 50°C para el compuesto **2**, y entre 15 y 45°C para **1** y **3**. Los espectros del compuesto **2** fueron medidos en la Dra. Teresa Atvars y el Dr. Marcelo Faleiros en el Instituto de Química de la Universidad Estadual de Campinas (SP, Brasil).

En la Figura 3.8 se puede apreciar la variación de los espectros estacionarios para los tres compuestos en DCM. Allí también se presenta la dependencia de la energía de los máximos de las bandas N* y T* para **2** con la temperatura, así como también los cambios de la fracción de emisión debida a N*, $\frac{I_{N^*}}{I_{N^*} + I_{T^*}}$. Para **2** y **3**, los compuestos que mayor separación de carga presentan luego de ser excitados, se puede apreciar un desplazamiento termocrómico hacia el azul al aumentar la temperatura (figuras 3.8.B y 3.8.C). Este fenómeno se explica a partir del siguiente argumento: al aumentar la temperatura se produce una disminución de la constante dieléctrica del solvente y por lo tanto una merma en la interacción entre el estado ESICT y el solvente. Esto tiene como consecuencia directa una menor estabilización de N*, dando lugar a la emisión desde un estado de mayor energía y un consecuente corrimiento hipsocrómico. En el compuesto **1** (Figura 3.8.A), que presenta menor separación de carga en N*, la sensibilidad al cambio de temperatura es significativamente menor. El comportamiento de **2** se estudió en un intervalo de temperaturas

mayor por ser el compuesto más sensible a los cambios de temperatura. Se puede ver que el solvatocromismo y el termocromismo se encuentran estrechamente relacionados, ya que ambos se basan en el peso que adquieren en distintos contextos (variación de solvente o de temperatura) las interacciones dipolares entre los estados excitados y las moléculas de solvente.

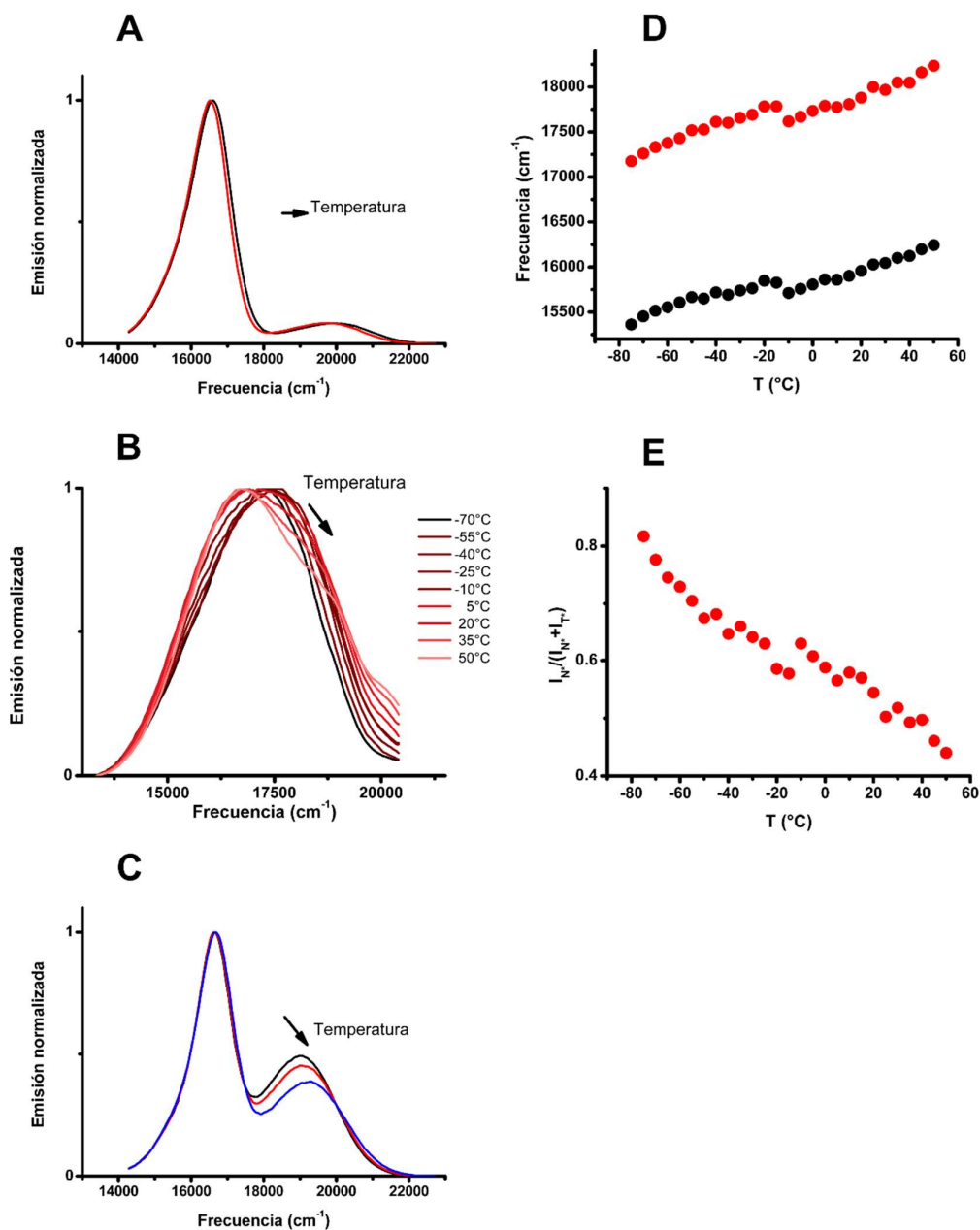


Figura 3.8. (A), (B) y (C): Espectros de emisión estacionaria normalizados al máximo en DCM para los compuestos **1**, **2** y **3** respectivamente. La temperatura en (A) es de 15 y 45°C, mientras que en (C) es 15°C, 25°C y 45°C. (D): Variación de la energía de los máximos de la banda N* (rojo) y T* (negro) para **2** en DCM en función de la temperatura. (E): Dependencia de la fracción de I_{N^*} respecto de la emisión total $I_{N^*}+I_{T^*}$ para **2** en DCM a distintas temperaturas.

Observando la Figura 3.8.D se puede apreciar que la susceptibilidad de la banda N* a cambios de temperatura es levemente mayor que la de la banda T* (entre -70°C y 50°C varían

1055 cm⁻¹ vs. 892 cm⁻¹ respectivamente). A su vez, la sensibilidad a cambios de temperatura en el intervalo -70°C/50°C para **2** es menor a la debida al cambio de solvente, donde la banda N* se llega a correr 2494 cm⁻¹. Finalmente, la variación de $\frac{I_{N^*}}{I_{N^*}+I_{T^*}}$ con la temperatura (Figura 3.8.E) para **2** refleja el mayor peso de T* a temperaturas elevadas, lo cual se explica principalmente por la dependencia de la posición de equilibrio con la temperatura. En este caso, al producirse un aumento del peso de la emisión de T* a temperaturas altas, se puede decir que el proceso ESIPT es endotérmico (esta aseveración supone que el rendimiento cuántico de fluorescencia de ambas especies no cambia apreciablemente con la temperatura). Este fenómeno se vincula con la energía de activación de la transferencia de protón intramolecular y en el inciso 2.3. se aborda con mayor profundidad.

2.1.3. Anisotropía de fluorescencia

En el presente trabajo se obtuvieron espectros de anisotropía de excitación y de emisión para el compuesto **3** en *n*-octanol a 15°C. La elevada viscosidad del solvente reduce los movimientos rotacionales y por lo tanto evita una despolarización total de la emisión. El análisis combinado de los espectros de excitación y emisión permite obtener información global sobre las distintas transiciones de excitación y de emisión que pueden tener lugar, lo cual es de particular relevancia en un sistema con múltiples especies involucradas tras la absorción de un fotón.

En la Figura 3.9 se pueden ver los espectros de anisotropía de excitación y de emisión de **3** en *n*-octanol a 15°C. La anisotropía de excitación muestra que hay al menos dos transiciones con distintas orientaciones de sus momentos de transición. La banda a menor longitud de onda (300-370 nm) posee una anisotropía levemente negativa y se debe probablemente a una transición hasta S₂. Por otro lado, la banda presente a mayores longitudes de onda (370-490 nm), cuya anisotropía se encuentra en 0,10-0,12, corresponde a la excitación hasta un estado emisor S₁. La presencia de dos bandas de absorción correspondientes a distintos estados excitados fue observada recientemente para otros derivados de 3-HC, donde se determinó un proceso ESIPT más eficiente por excitación a estados S_n con n>1¹⁷⁰. El valor de *r* correspondiente a la transición a S₁ es menor a 0,4 debido en parte a la no coincidencia de la orientación de los momentos de transición de absorción y de emisión, y en parte a la difusión rotacional en *n*-octanol durante los 4 ns correspondientes al tiempo de vida de fluorescencia (ver inciso 2.3). Por otro lado, el aumento de *r* por encima de 425 nm puede deberse a la presencia de luz dispersa.

La anisotropía de emisión obtenida tras la excitación con luz de 320 nm presenta valores levemente negativos, y muestra un cambio notorio al pasar de la banda N* a la banda T* cerca de

565 nm. Esta observación es una evidencia de que los momentos de transición de emisión de N^* y T^* poseen distinta orientación.

Finalmente, como prueba de consistencia, se puede ver que el valor de r (320nm) en el espectro de excitación coincide con el de r (530nm) en el de emisión (aproximadamente -0,01).

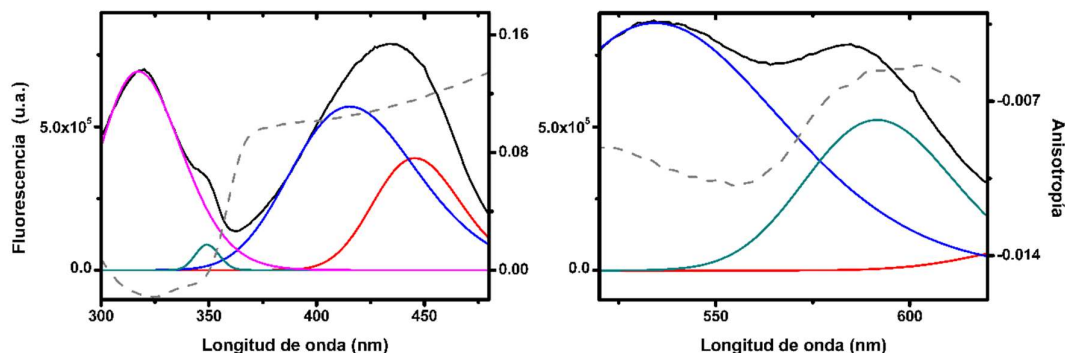


Figura 3.9. Espectros de anisotropía estacionaria de excitación (izquierda) y de emisión (derecha) del compuesto **3** en *n*-octanol a 15°C. En línea punteada se representa el valor de r . En línea negra se muestran los espectros de excitación y de emisión totales corregidos, mientras que los componentes gaussianos de la deconvolución se presentan en líneas sólidas coloreadas. En los espectros de excitación la emisión se detectó a 530 nm y en los de emisión se excitó a 320 nm.

2.2. Cálculos mecano-cuánticos

Los estudios computacionales fueron llevados adelante por la Dra. Verónica Sánchez, en el CSC-CONICET. Los cálculos de DFT (por *Density Functional Theory*) se realizaron sobre los tres compuestos en sus formas N y T . Los momentos dipolares de N y T en estado fundamental y excitado se presentan en la Tabla 3.2. Allí se puede ver el aumento en el momento dipolar que tiene lugar al poblarse N^* luego de la excitación. Esta observación está de acuerdo con lo informado para DMAHF y otros derivados de 3-HC⁷⁹, y es una evidencia más del proceso de transferencia de carga intramolecular en estado excitado a partir del cual se explican los comportamientos solvato- y termocrómicos. Por otro lado, se puede ver que el mayor aumento en el momento dipolar se da en el compuesto **2**, seguido por **3** y **1**, coincidiendo este orden con el observado en la relación I_{N^*}/I_{T^*} y en el corrimiento de Stokes para un dado solvente (Figura 3.5). A su vez, esta tendencia se encuentra en concordancia con la mayor susceptibilidad solvatocrómica de 7-(4-*N,N*-dimetilaminofenilo)-3-HC en comparación con DMAHF⁸⁵.

1				2				3			
N	N*	T	T*	N	N*	T	T*	N	N*	T	T*
9,4	14,4	10,6	10,7	8,4	24,4	10,8	12,2	7,6	16,8	7,4	8,1

Tabla 3.2. Momentos dipolares (en unidades Debye, D) de N, T, N* y T* para los compuestos 1, 2 y 3.

En la Figura 3.10 se muestran los orbitales moleculares HOMO y LUMO del compuesto 2 en sus formas N y T. Allí puede verse con claridad el carácter de transferencia de carga de la transición HOMO-LUMO: la densidad electrónica se redistribuye desde el grupo 4-*N,N*-dimetilaminofenilo en el N-HOMO hacia la parte complementaria de la molécula en el N-LUMO (el 4-carbonilo y parte del 2-tienilo). Por otro lado, en el panel derecho se puede apreciar la orientación de los momentos dipolares de transición HOMO-LUMO (S_0-S_1 , representado por el vector negro, 1) y HOMO-LUMO+1 (S_0-S_2 , representado por el vector rojo, 2). Se puede ver que los vectores 1 y 2 presentan un ángulo cercano a 90°, apoyando la observación de dos bandas de excitación entre 300 y 500 nm con una anisotropía de excitación muy diferente entre sí (ver Figura 3.9).

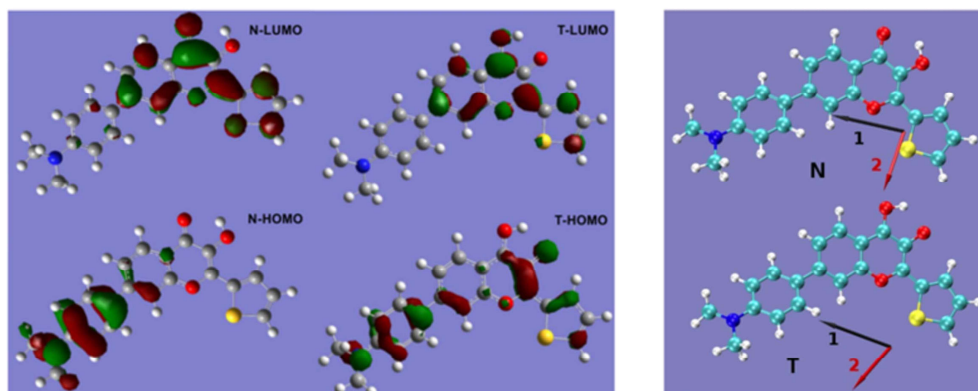


Figura 3.10. Orbitales moleculares de isodensidad electrónica de 0.04 e bohr⁻³ HOMO y LUMO del compuesto 2, tanto para su forma N como para T (izquierda). A la derecha se presenta la orientación de los momentos dipolares de las transiciones HOMO-LUMO (1) y HOMO-LUMO+1 (2).

Con la finalidad de comprobar la exactitud del método utilizado, se analizaron también dos compuestos (DMAHF y FHC) y se compararon los resultados obtenidos con otros informados en literatura^{79,171}. En particular, se halló tras una optimización de la geometría de DMAHF y FHC que las mismas eran casi plana (ángulo diedro entre el anillo B y 4-*N,N*-dimetilaminofenilo igual a 17°) y plana, respectivamente. Estas observaciones coinciden con la de los trabajos citados. Por otro lado, la distancia intramolecular entre el O del 4-carbonilo y el H del alcohol obtenida fue de 1,97 y 2,04 Å para DMAHF y FHC, siendo estos valores comparables a los de compuestos similares. Finalmente, el cálculo de los orbitales moleculares HOMO y LUMO de ambos compuestos, que se presentan en la Figura 3.11, coinciden con los obtenidos por Kenfack⁷⁹. En los orbitales

moleculares puede apreciarse una menor separación de la carga que en el compuesto **2** (Figura 3.10) en el LUMO, lo cual se refleja también en un menor aumento del momento dipolar en el estado excitado (de 7,3 a 16,3 D y de 3,5 a 6,4 D para DMAHF y FHC, mientras que el de **2** fue de 8,4 a 24,4 D; ver Tabla 3.2). Esta diferencia se puede explicar a partir del sustituyente 2-tienilo, ausente en DMAHF y FHC, que en **2** permite una mayor deslocalización de la carga en el estado excitado.

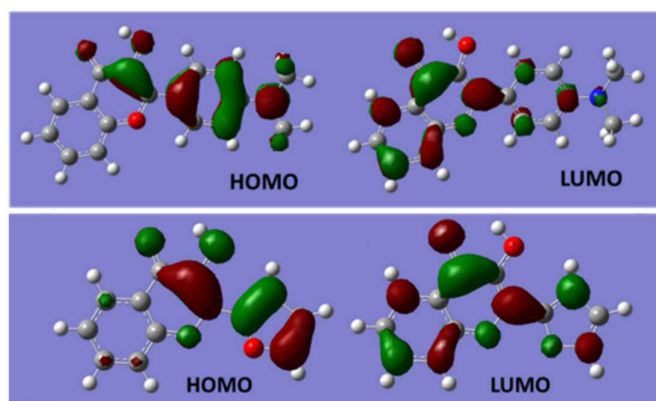


Figura 3.11. Orbitales moleculares de isodensidad electrónica de 0.04 e bohr⁻³ HOMO y LUMO de DMAHF (panel superior) y FHC (panel inferior).

2.3. Fluorescencia resuelta en el tiempo

El decaimiento de la fluorescencia en los compuestos **1-3** cuenta con dos componentes: uno de tiempo corto (desde <10 ps hasta 450 ps, entre 15 y 45°C) correspondiente al proceso ESIPT y uno de tiempo prolongado (3-4 ns) debido a la transición desde N* y T* hacia S₀. En la Figura 3.12 se puede apreciar el decaimiento para el compuesto **2** en diclorometano a 20°C, monitoreado a 530 nm y a 630 nm con el fin de analizar la variación de la concentración de N* y T*, respectivamente. En ambas curvas puede observarse que existen dos procesos con tiempos característicos bien diferentes. El decaimiento se puede describir como la suma de dos funciones exponenciales. El proceso más rápido se ve a 630 nm como el crecimiento de T* y a 530 nm como la disminución de N*, debido al proceso ESIPT (ver el acercamiento presente en el recuadro de cada figura). A tiempos largos se aprecia un decaimiento que tiene la misma pendiente para ambos compuestos. Este es el decaimiento esperable para un sistema en equilibrio. El tiempo de vida de fluorescencia corresponde al promedio ponderado del tiempo característico de N* y T* según sus fracciones en el estado de equilibrio. Para los compuestos **1** y **3** se observó un comportamiento similar, aunque con tiempos característicos del proceso ESIPT apreciablemente menores (<10 ps para **1** y **3** en diclorometano).

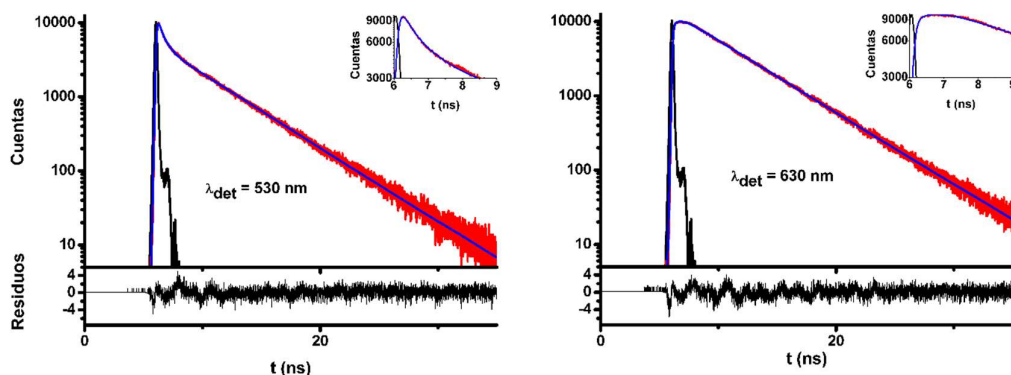


Figura 3.12. Decaimiento de fluorescencia para **2** en diclorometano a 20°C. Izquierda: emisión debida a N*; derecha: emisión debida a T*. Recuadros: acercamiento a tiempos cortos, donde se encuentra el pulso y se puede apreciar el crecimiento de la banda T* (panel derecho) y el decaimiento de la banda N* (panel izquierdo) asociados al proceso ESIPT.

En la Tabla 3.3 se presentan tiempos característicos medidos para los tres compuestos en distintos solventes y temperaturas. Teniendo en cuenta el ancho de pulso del diodo láser utilizado (150 ps), se puede ver que la medición de la velocidad del proceso rápido en **2** tiene una mayor precisión que en los demás casos. Por tal motivo, se estudió su comportamiento en un intervalo amplio de temperaturas (-70°C a 50°C, al igual que en la emisión estacionaria). Finalmente, se puede apreciar que a bajas temperaturas los tiempos del proceso rápido y del lento para **2** son del mismo orden de magnitud, por lo cual no se puede pensar el establecimiento del equilibrio del ESIPT y la desactivación radiativa como dos procesos desacoplados temporalmente.

Compuesto	Solvente	T (K)	$\tau_{\text{rápido}}$ (ns)	τ_{lento} (ns)
1	DCM	298	0,010	3,03
		480-660 nm		
	TOL	288	0,016	3,00
		475-600 nm	<0,010	2,65
2	DCM	198	2,63	3,90
		530-630 nm	228	1,60
			248	1,12
			288	0,544
			298	0,459
			308	0,388
			318	0,321
			328	0,283
	TOL	288	0,155	4,08
		465-580 nm	0,354	3,96
3	DCM	288	<0,010	2,68
		520-600 nm	<0,010	2,19
	TOL	288	0,032	2,87
		485-600 nm	0,010	2,28

Tabla 3.3. Tiempos característicos del proceso rápido ($\tau_{\text{rápido}}$) y del lento (τ_{lento}) para 1-3 en distintos solventes y temperaturas. Las longitudes de onda corresponden a la detección de la emisión de N^* y T^* .

A partir de las curvas de decaimiento de la emisión registradas a diferentes longitudes de onda (500-660 nm), se pueden obtener los espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo (TRES), tal como se explicó en el Capítulo 2.

En la Figura 3.13 se presentan los TRES de **2** (normalizados por área) en diclorometano a 25°C. En la figura se puede apreciar cómo, en forma relativa, se produce la disminución de la banda N^* y el ascenso de la banda T^* en función del tiempo. A tiempos cortos estas variaciones relativas son significativas, mientras que, transcurrido un determinado período, los cambios son mínimos y se llega finalmente a una situación de equilibrio. A su vez, los espectros muestran un punto isoemisivo, que representa una evidencia de la interconversión entre únicamente dos especies fluorescentes (en este caso, N^* y T^*). Se puede apreciar la presencia de T^* a $t=0$, por lo que se puede concluir que parte de T^* se forma por excitación directa de T en estado fundamental por el pulso de 405 nm. Esto demuestra la existencia de T en equilibrio con N en el estado fundamental para **2** a 25°C en diclorometano, lo cual no ha sido informado para otros derivados de 3-HC.

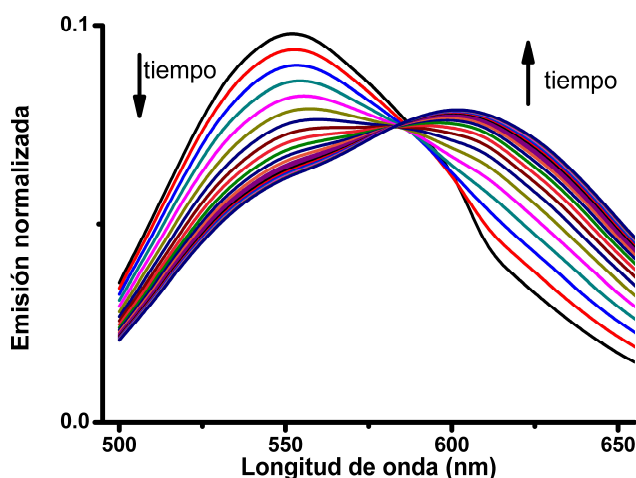


Figura 3.13. Espectros de emisión resueltos en el tiempo (TRES) normalizados por área de **2** en DCM a 25°C. Los tiempos están espaciados 100 ps y van entre 0 y 2 ns.

2.4. Discusión

A través de distintas determinaciones se ha podido mostrar el efecto de sustituyentes dadores y aceptores de electrones en las posiciones 2 (anillo B) y 7 (anillo A) de la 3-HC. Se pudo verificar que la presencia de dos grupos dadores de carga en ambas posiciones (compuesto **1**) disminuyen el carácter de transferencia de carga de N^* en comparación con DEAHF, mientras que los compuestos con comportamiento *push-pull* tienen mayor separación de carga en estado excitado. El efecto de tener el dador de electrones en el anillo A y el aceptor en B (compuesto **2**) es mayor que en el caso inverso (compuesto **3**), en línea con la mayor susceptibilidad solvatocrómica observada para la banda N^* en 7-(4-*N,N*-dimetilaminofenilo)-3-HC en comparación a DEAHF⁸⁵. El mayor peso del proceso ESICT en **2** se verificó por su mayor corrimiento de Stokes y peso de la banda N^* para un dado solvente, por el gran aumento del momento dipolar después de la excitación determinado en forma computacional y por su mayor susceptibilidad solvato- y termocrómica (ver Tabla 3.1).

A su vez, las determinaciones de fluorescencia resuelta en el tiempo permitieron detectar el proceso rápido de establecimiento del equilibrio entre N^* y T^* , evidenciada por un aumento de la emisión de T^* y una disminución de N^* en los TRES a tiempos cortos (ver el recuadro de las figuras 3.12 y 3.13). El posterior decaimiento desde una situación de equilibrio se pudo verificar por la medición de un único tiempo característico a longitudes de onda donde emiten exclusivamente N^* o T^* (ver pendiente a tiempos largos en Figura 3.12). Los espectros resueltos en el tiempo permitieron también comprobar la presencia de T en el estado fundamental para **2** en diclorometano a 25°C, ya el espectro correspondiente a $t=0$ cuenta con una proporción

apreciable de T^* que no proviene de la interconversión N^*-T^* y por lo tanto solo pueden deberse a excitación directa de T por el pulso de 405 nm. Las bandas de absorción de N y T se hallan por lo tanto solapadas a esa longitud de onda (en la Figura 3.9 se puede ver que la banda asociada a S_0-S_1 presenta más de una componente gaussiana).

Con el objetivo de obtener los distintos parámetros cinéticos asociados al proceso ESIPT, se realizó un estudio de la variación de los tiempos característicos con la temperatura para **2** en diclorometano. Una primera observación a tener en cuenta es la disminución de la emisión de N^* respecto de la emisión estacionaria total ($\frac{I_{N^*}}{I_{N^*}+I_{T^*}}$), señalada anteriormente. Este fenómeno, detectado para **2** y **3**, puede explicarse si se supone que el proceso ESIPT es endotérmico. Por otro lado, en la Tabla 3.2 se puede ver que el tiempo corto de **2** decrece con la temperatura, mientras que el tiempo largo aumenta. Para explicar esta observación, se deben tener en cuenta las ecuaciones cinéticas (ecuaciones 3.1 y 3.2) que se derivan del esquema de la Figura 3.14¹⁵⁹:

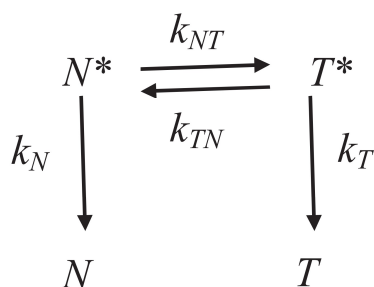


Figura 3.14. Esquema cinético del proceso ESIPT y de la emisión dual. Las k_i representan las constantes cinéticas unimoleculares de cada proceso.

$$\frac{d[N^*]}{dt} = -(k_{NT} + k_N)[N^*] + k_{TN}[T^*] \quad [3.1]$$

$$\frac{d[T^*]}{dt} = k_{NT}[N^*] - (k_{TN} + k_T)[T^*] \quad [3.2]$$

Las ecuaciones 3.1 y 3.2 dan lugar al conocido resultado de la suma de dos exponenciales para el decaimiento de N^* y T^* con dos tiempos característicos. La expresión de estos últimos ($k_{rápido} = \frac{1}{\tau_{rápido}}$ y $k_{lento} = \frac{1}{\tau_{lento}}$) se puede obtener en forma compacta a través de su suma y su producto, tal como se muestra en las ecuaciones 3.3 y 3.4¹⁵⁹:

$$k_{rápido} + k_{lento} = k_{NT} + k_{TN} + k_T + k_N \quad [3.3]$$

$$k_{rápido}k_{lento} = k_{NT}k_T + k_N(k_{TN} + k_T) \quad [3.4]$$

Si los pasos de establecimiento del equilibrio son mucho más rápidos que los decaimientos hacia S_0 , es decir $k_{NT}, k_{TN} \gg k_N, k_T$, los procesos se encuentran desacoplados y se obtienen las

expresiones simplificadas de las ecuaciones 3.5 y 3.6. La primera de ellas corresponde a un mecanismo de reacciones opuestas que llegan a una situación de equilibrio y cuya constante cinética es la suma de los pasos directo e inverso. La segunda expresión representa la emisión desde el estado de equilibrio cuya constante cinética es un promedio ponderado de las constantes de N^* y de T^* , según el peso de cada especie en el equilibrio dado por $\frac{k_{ij}}{k_{ij}+k_{ji}}$.

$$k_{rápido} = k_{NT} + k_{TN} \quad [3.5]$$

$$k_{lento} = \frac{k_{NT}}{k_{NT}+k_{TN}} k_T + \frac{k_{TN}}{k_{NT}+k_{TN}} k_N \quad [3.6]$$

Los compuestos **1** y **3** presentan una constante rápida al menos 30 veces más grande que la constante lenta en el intervalo de temperaturas estudiado (ver Tabla 3.3), motivo por el cual su comportamiento cinético se puede explicar cualitativamente en base a las ecuaciones 5 y 6. En estos casos, tanto k_{TN} como k_{NT} pueden ser procesos activados, cumpliendo las respectivas energías de activación de los pasos de la transferencia de protón $E_{TN} < E_{NT}$ para una tautomerización endotérmica. La endotermicidad del proceso fue demostrada para **3** (y también para **2**) en los experimentos de emisión estacionaria. Para **1**, entre 15°C y 45°C la sensibilidad del estado de equilibrio ESIPT respecto a los cambios de temperatura es menor y no se pudieron apreciar cambios significativos en los espectros estacionarios en diclorometano. Sin embargo, es esperable que el proceso también sea endotérmico. El decrecimiento del tiempo de vida más lento observado para **1** y **3** con el aumento de la temperatura (Tabla 3.3) se puede explicar para un proceso ESIPT endotérmico si $k_T > k_N$, ya que el equilibrio tautomérico se encuentra desplazado hacia T^* a altas temperaturas y k_{lento} tiende al valor de k_T .

El escenario cinético de **2** es diferente. Si bien hay un proceso lento y uno rápido, a temperaturas bajas los mismos se encuentran acoplados ya que ocurren a tiempos comparables, mientras que, al aumentar la temperatura, la diferencia relativa entre ambos llega a ser de un factor 20. Por otro lado, en forma inusual, el tiempo largo tiende a aumentar con la temperatura, evidenciando una relación de las constantes de desactivación de N^* y T^* inversa a la de los casos **1** y **3**: para **2** vale $k_T < k_N$. Al contar con procesos acoplados, es necesario trabajar con las expresiones completas presentadas en las ecuaciones 3 y 4. Sin embargo, estas ecuaciones dan lugar a seis incógnitas si se consideran dos procesos activados (k_{NT} y k_{TN}) y dos con energía de activación despreciable (k_T y k_N). Realizar un ajuste de la variación de $k_{rápido} * k_{lento}$ y $k_{rápido} + k_{lento}$ en función de la temperatura con tantas variables puede llevar a resultados inexactos. Por tal motivo, una mejor aproximación consiste en abordar el escenario por partes donde prevalezcan unos procesos por sobre otros y se puedan aproximar algunas de las variables

con cierto nivel de confianza. En particular, a altas temperaturas el proceso que prevalece entre la conversión $N^* \rightarrow T^*$ y $T^* \rightarrow N^*$ es el de mayor energía de activación, que en este caso es k_{NT} . Por lo tanto, en ese intervalo de temperaturas una curva de $\ln(k_{\text{rápido}}) \text{ vs. } T^{-1}$ da lugar a los parámetros de Arrhenius correspondientes a k_{NT} . En el panel izquierdo de la Figura 3.15 se muestra la curva de Arrhenius y el ajuste correspondiente. A partir de la misma, se obtuvo un valor de $E_{NT} = 13,5 \text{ kJ/mol}$ y $A_{NT} = 500 \text{ ns}^{-1}$. Por otro lado, en el panel derecho de la misma figura se puede apreciar la variación de k_{lento} con la inversa de la temperatura. Allí se ve que a temperaturas altas, donde prevalece T^* , k_{lento} tiende a $0,21 \text{ ns}^{-1}$, mientras que en el límite de temperaturas bajas, donde el equilibrio se desplaza hacia N^* , vale en promedio $0,26 \text{ ns}^{-1}$. Por lo tanto, el primer valor puede asociarse a k_T y el segundo a k_N .

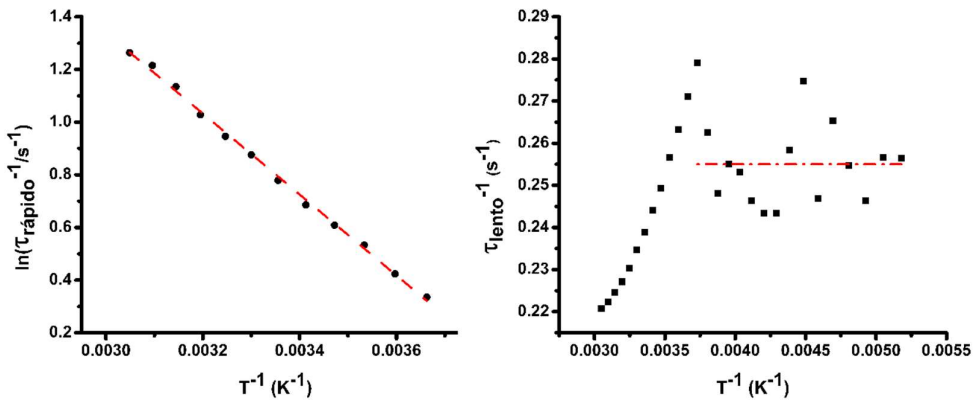


Figura 3.15. Curva de Arrhenius en el límite de alta temperatura para la constante cinética rápida (izquierda). En línea punteada roja se muestra la regresión lineal. A la derecha: variación de la constante lenta en función de la inversa de la temperatura. En línea punteada roja se representa el valor promedio de la constante a temperaturas bajas.

Una vez estimadas cuatro de las seis variables (k_{NT} , A_{NT} , k_N y k_T), se realizó un ajuste de la suma y el producto de las constantes rápida y lenta con solamente dos variables a determinar (A_{TN} y E_{TN}). El resultado del mismo arrojó valores de A_{TN} y E_{TN} de $13,4 \text{ ns}^{-1}$ y $10,0 \text{ kJ/mol}$, respectivamente. En la Figura 3.16 se muestra que los valores experimentales y los obtenidos a partir de las variables calculadas se asemejan cuando se grafica $\ln \left[\frac{k_{\text{rápido}} k_{\text{lento}}}{\text{ns}^{-2}} \right]$ y $\ln \left[\frac{(k_{\text{rápido}} + k_{\text{lento}})}{\text{ns}^{-1}} \right]$ en función de $T^{-1} (\text{K}^{-1})$ entre 188 y 328 K.

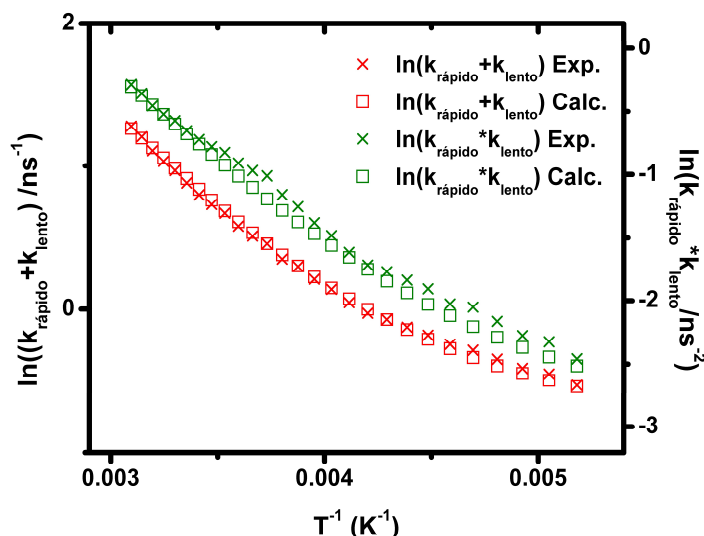


Figura 3.16. Variación del logaritmo natural del producto (verde) y la suma (rojo) de las constantes rápida y lenta en función de la inversa de la temperatura. En cruz se muestran los valores experimentales y en cuadrados, los calculados con las variables cinéticas estimadas.

Teniendo en cuenta las energías de activación halladas para la conversión $N^* \rightarrow T^*$ y $T^* \rightarrow N^*$, se puede ver que la diferencia energética entre ambas especies es aproximadamente $3,5 \text{ kJ/mol}$, ubicándose T^* por encima de N^* . Este valor y los de las energías de activación (10 kJ/mol) son comparables a los determinados para DMAHF en acetonitrilo y diclorometano^{164,172}. Por otro lado, la constante del equilibrio en estado excitado se puede estimar

$$\text{según } K_{NT}^* = \frac{[T^*]}{[N^*]} = \frac{k_{NT}}{k_{TN}} = 37 \exp\left(\frac{-3,5 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}}{RT}\right).$$

3. Conclusiones y perspectivas

En el presente capítulo se presentó el estudio cinético y espectroscópico en función de la temperatura de tres derivados distintos de 3-HC, con sustituyentes dadores y aceptores de electrones en los anillos A y B. Todos ellos presentan un comportamiento solvato- y termocrómico similar al de otras 3-HC sustituidas únicamente en el anillo B, pero el comportamiento *push-pull* del patrón de sustitución de los compuestos **2** y **3** hace que ellos sean más sensibles a la temperatura y cambios de solvente, dando como resultado una mayor variación en los corrimientos de Stokes y la relación I_{N^*}/I_{T^*} .

Las explicaciones de estos comportamientos a la luz de los cálculos computacionales mostraron que luego de la excitación electrónica se produce un aumento en el momento dipolar de la forma N, en la misma línea informada para otros derivados de 3-HC en literatura. Sin embargo, la sustitución en el anillo A en los compuestos estudiados resultó ser un elemento clave

en la magnitud de este fenómeno: el compuesto **2**, que presenta un aceptor de electrones en el anillo B y un dador en el A, posee un incremento del momento dipolar muy elevado, siendo mayor al de DMAHF y otras 3-HF.

Para **2** se pudo evidenciar la presencia de T en el estado fundamental gracias a estudios de fluorescencia resueltos en el tiempo. Esta observación no fue informada para otras 3-HC.

Por todo lo dicho, se puede concluir que la sustitución simultánea en los anillos A (posición 7) y B (posición 2) modulan fuertemente las propiedades espectroscópicas y el proceso ESIPT en derivados de 3-HC. La presencia de un dador y un aceptor de electrones en dichas posiciones produce una mejora significativa en la sensibilidad de los compuestos a las condiciones del entorno.

Estos hallazgos permiten arrojar luz y poder predictivo sobre los requisitos que deben cumplir los derivados de 3-HC como sensores de entornos microheterogéneos. En particular, presenta elementos a tener en cuenta en la sustitución del anillo A con estudios profundos de espectroscopía resuelta en el tiempo en función de la temperatura en un amplio intervalo, que hasta el momento no fue llevada adelante por otros grupos de investigación.

Un elemento que no se ha explorado en los compuestos **1-3** y que representa una perspectiva promisoría es su utilización como sonda fluorescente en procesos biológicos. En la introducción del actual capítulo se enumeraron ejemplos donde otras 3-HC y 3-HF se utilizaron para evaluar la dinámica de distintos procesos por espectroscopía y microscopía de fluorescencia. En particular, los compuestos presentados en este trabajo pueden ser de gran utilidad en ese tipo de experimentos por la elevada susceptibilidad a los cambios ambientales que presentan.

El desempeño de las 3-HC como sondas de microscopía de moléculas únicas y de súper-resolución no se ha explorado tampoco, pero la ausencia de trabajos publicados donde se las utilice para estas técnicas es un indicio de que probablemente no cumplan los requisitos necesarios para microscopías ultra-sensibles. En particular, su estabilidad fotoquímica puede ser su punto más débil, ya que evidencian hasta un 5% de descomposición en experiencias de TRES luego de varias horas de exposición a la excitación LED de 405 nm.

Capítulo 4: Síntesis de un antagonista fluorescente para el estudio de CRHR1 por microscopía y nanoscopía de fluorescencia

1. Introducción

En el presente capítulo se describe la selección, síntesis, caracterización y aplicación de un derivado nitrogenado de boro dipirrometeno (aza-BODIPY), que funciona como antagonista de CRHR1. El principal objetivo de esta parte del trabajo de tesis fue desarrollar una sonda fluorescente con propiedades fotoquímicas y fotofísicas adecuadas para la obtención de imágenes de súper-resolución de CRHR1. Para alcanzar este objetivo, se aplicaron herramientas de *docking* con la finalidad de predecir la afinidad de distintos aza-BODIPYs hacia el sitio de unión de antagonistas no-peptídicos de CRHR1. Posteriormente se diseñó una ruta sintética para obtener el compuesto seleccionado. Finalmente, a través de estudios biológicos se estudió la actividad del compuesto como antagonista de CRHR1. También se analizó la afinidad del compuesto hacia CRHR1 por microscopía de súper-resolución.

El fluoróforo escogido fue un aza-BODIPY asimétrico, al que llamamos ABP-09 y cuya estructura se presenta en la Figura 4.1. Se arribó a esta estructura por estudios de simulación computacional con diversas estructuras blanco ubicadas en el sitio antagonista de CRHR1 y por criterios de estabilidad fotoquímica.

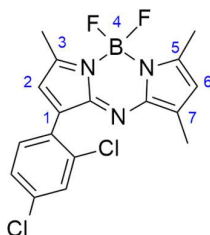


Figura 4.1. Estructura del compuesto ABP-09.

La vía de síntesis mayormente utilizada para este tipo de compuestos (aza-BODIPYs asimétricos) consiste en la búsqueda inicial de un aza-dipirrometeno asimétrico, generado por la reacción entre un pirrol con un sustituyente nitroso (-NO) en su posición 2 con otro que tiene su posición 2 libre¹²³. En Figura 4.2 se puede apreciar la reacción en forma genérica, que se encuentra descrita en literatura para compuestos con sustituyentes (R) de tipo aromáticos. Por otro lado, hasta el momento de la escritura de esta tesis no se hallaron aza-dipirrometenos en literatura con sustituyentes metílicos en las posiciones requeridas para la posterior obtención de ABP-09^{109,118,116,110}.

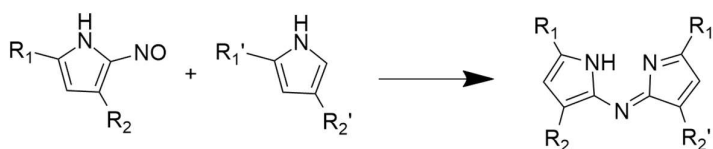


Figura 4.2. Vía de síntesis propuesta en literatura para la formación de aza-dipirrometenos asimétricos. Las condiciones de reacción fueron el calentamiento a 100°C durante 1 hora en una mezcla de ácido acético y anhídrido acético.

Este hecho nos llevó a considerar otra vía para la síntesis del aza-dipirrometeno, que consiste en hacer reaccionar un pirrol 2,4-disustituido con una 4-aril-5-nitro-butan-2-ona. Esta vía no se encuentra hasta el momento descrita para la síntesis de aza-dipirrometenos asimétricos, pero un estudio mecanístico de dicha reacción permitió prever que en estas condiciones es posible obtener el compuesto asimétrico deseado como parte de los productos¹²⁵. Esta fue la vía que permitió obtener como producto final el aza-BODIPY de la Figura 4.1. En la Figura 4.3 se presenta el esquema genérico de esta ruta.

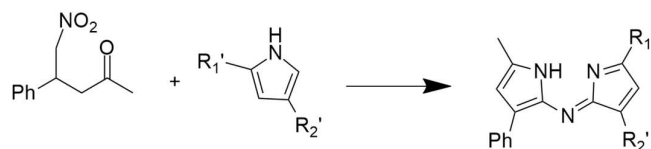


Figura 4.3. Vía de síntesis alternativa para la formación de aza-dipirrometenos asimétricos. Las condiciones de reacción fueron el calentamiento a reflujo en metanol junto con 35 equivalentes de acetato de amonio durante 10 hs.

El compuesto ABP-09 se obtuvo finalmente por reacción del aza-dipirrometeno con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ¹²⁶. Una vez aislado, se estudiaron sus propiedades fotofísicas y su desempeño para microscopía de súper-resolución (STORM). Se pudo comprobar que el compuesto tiene propiedades de *blinking* y de brillo apropiadas para esta técnica.

Se realizaron estudios biológicos para conocer la actividad del compuesto como antagonista de CRHR1. La determinación de la fosforilación de ERK y de Akt por medio de *Western blot*, así como la cuantificación de la producción de cAMP a través de mediciones de FRET por microscopía confocal utilizando un biosensor basado en Epac^{98,102}, permitieron confirmar que ABP-09 disminuye la actividad de CRHR1 en respuesta al estímulo de su ligando CRH.

Por otro lado, se realizaron estudios de doble marcación de CRHR1 a través del uso de anticuerpos primarios de ratón anti-cMyc y secundarios conjugados a AlexaFluor647 en células pre-incubadas con ABP-09. La colocalización, pensada en el contexto de microscopía de fluorescencia convencional, no aporta información sobre proximidades más allá de 200-250 nm, debido al límite de resolución impuesto por la difracción de la luz visible. Estas distancias pueden dar información sobre la coexistencia en una misma región sub-celular, pero no revelan detalles sobre una posible interacción entre las moléculas colocalizadas. El uso de técnicas de súper-

resolución, por su parte, permite conocer distancias en el orden de los nanómetros o pocas decenas de nanómetros. Por tal motivo, el análisis cuantitativo de distancias y distribuciones en el marco de las nanoscopías ha adquirido especial relevancia y es un área en pleno desarrollo^{173,174}. Es importante señalar que proximidades de decenas de nanómetros siguen siendo indicadores de posibles interacciones y no una evidencia directa de las mismas, que ocurren a distancias aún menores¹⁷⁵. En la literatura existen análisis de distribución de *clusters*, de funciones de correlación de pares o de patrones de distribución de puntos para estimar estadísticamente la significancia de esas cercanías en comparación con localizaciones distribuidas al azar^{176–179}. En este capítulo, se muestran imágenes de súper-resolución de dos colores y se presenta un estudio la afinidad entre ABP-09 y CRHR1. Para ello, se desarrolló un algoritmo de análisis de distancias, se estimó la constante de afinidad y se compararon los resultados obtenidos con los correspondientes a distribuciones aleatorias de las localizaciones, observándose una mayor afinidad entre ABP-09 y el CRHR1 que la predicha por una mera colocalización al azar.

2. Resultados y discusión

2.1. Selección de aza-BODIPYs

La evaluación de distintos aza-BODIPYs como posibles antagonistas se realizó a través de un estudio de *docking*, llevado a cabo por el Dr. Claudio Cavasotto (IBioBA-CONICET-MPSP). A partir de dicho estudio, donde también se analizaron antagonistas comerciales de CRHR1, se seleccionó un candidato para llevar adelante su síntesis. El aza-BODIPY escogido (ABP-09) presentó una interacción con el receptor comparable con la de los antagonistas comerciales.

El desarrollo de antagonistas de CRHR1 y sus posibles aplicaciones como drogas terapéuticas se encuentran ampliamente estudiados¹⁸⁰. Los candidatos propuestos inicialmente se basaron en estudios previos, donde se determinaron los requerimientos estéricos y de grupos funcionales que debía cumplir una molécula para unirse al sitio de unión alostérico de CRHR1¹⁸¹. En particular, desde el trabajo de Hollenstein¹⁰⁷, donde CRHR1 fue cristalizado junto al antagonista CP-376395¹⁸² (estructura cristalina de CRHR1: PDB 4K5Y), fue posible conocer con precisión el tipo de interacción entre los distintos aminoácidos y el antagonista.

En la Tabla 4.1 se presentan los compuestos estudiados. A la izquierda (parte superior) se puede ver la estructura principal de aza-BODIPY y en la tabla se muestra el detalle de los sustituyentes de cada candidato. También se analizaron con el mismo programa y las mismas aproximaciones los antagonistas comerciales CP-376395 y ONO-2333Ms¹⁸¹, cuyas estructuras se presentan en la parte inferior-izquierda de la tabla.

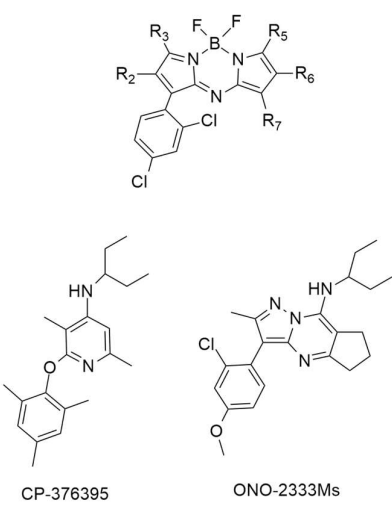
 CP-376395 ONO-2333Ms	Estructura	R ₂	R ₃	R ₅	R ₆	R ₇
		H	H	Me	Me	H
	ABP-0	H	H	Me	Me	H
	ABP-01	Me	H	H	H	H
	ABP-02	H	H	H	H	H
	ABP-03	H	Me	H	H	H
	ABP-04	Me	Me	H	H	H
	ABP-05	Me	H	Me	H	H
	ABP-06	Me	H	H	Me	H
	ABP-07	H	Me	Me	H	H
	ABP-08	H	Me	H	Me	H
	ABP-09	H	Me	Me	H	Me
	ABP-10	H	H	Me	H	Me
	ABP-11	Me	H	Me	H	Me

Tabla 4.1. Estructuras propuestas para realizar estudios de *docking*.

La pose de menor energía de CP-376395 mostró un RMSD (por las siglas en inglés de *root-mean-square deviation*) muy bajo (0,4 Å) en comparación a la estructura cristalina, mientras el ligando ONO-2333 Ms tuvo una superposición apreciable con CP-376395, manteniendo el puente hidrógeno clave con N283^{5,50} (en superíndice se muestra el número de Wootten¹⁸³). En la Figura 4.4 se puede ver la superposición de ambos compuestos en el sitio de unión de antagonistas de CRHR1.

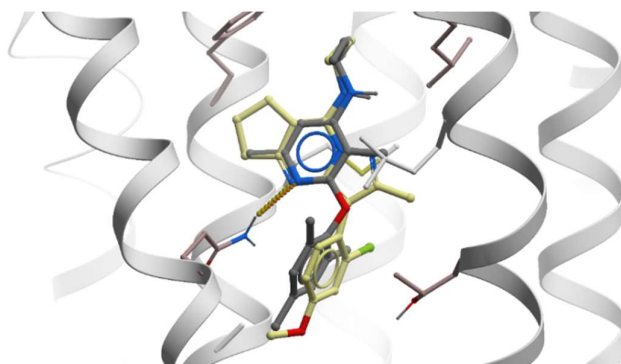


Figura 4.4. Superposición de las estructuras de CP-376395 (C en gris) y ONO-2333 Ms (C en amarillo) dentro del sitio de unión de antagonistas pequeños de CRHR1. El puente hidrógeno presente entre ambos compuestos y N283^{5,50} se muestra como pequeñas bolas. Los aminoácidos claves en la interacción de CRHR1 con los antagonistas se muestran como palos. Rojo: oxígenos; azul: nitrógenos. Figura realizada por el Dr. Claudio Cavasotto.

Los resultados de *docking* arrojan que la interacción del receptor con antagonista más favorable se da en el caso de CP-376395, mientras que ONO-2333 Ms y algunos de los candidatos aza-BODIPY tienen una interacción comparable a la de CP-376395, aunque levemente menor. Para obtener un resultado más preciso respecto a la afinidad por el receptor, se realizó un cálculo de

energías utilizando una metodología de ligando flexible-receptor flexible, similar a la aproximación orientada por ligando^{157,158,184}, pero reemplazando el muestreo estocástico por una minimización local de energía más rápida. Así, la energía libre de unión se aproximó según la Ecuación 4.1.

$$\Delta G \cong E_{\text{complejo}} - E_{\text{receptor}} - E_{\text{ligando}} \quad [4.1]$$

Ecuación 4.1. Expresión utilizada para obtener la energía libre de unión entre un antagonista y CRHR1.

En esta ecuación, la componente entrópica no se tuvo en cuenta ya que se buscó determinar la energía libre de unión solamente en forma semi-cuantitativa. Con esta aproximación, el orden de energías libres de unión fue la siguiente:

$$\text{CP-376395} < \text{ONO-2333Ms b} \approx \text{ABP-09} \approx \text{ABP-11} \approx \text{ABP-10}$$

En la Figura 4.5 se muestra la interacción de ABP-09 con CRHR1. Allí se puede apreciar la conservación del enlace de hidrógeno entre el nitrógeno *aza* y N283^{5,50}, mientras que el grupo 2,4-diclorofenil ocupa la misma región que el 2,4,6-trimetiloxifenil de CP-376395. Teniendo en cuenta este resultado y la necesidad de obtener un compuesto con estabilidad fotoquímica (que en ABP-10 y ABP-11 se ve disminuida por tenerla posición R₃ libre), se escogió el ABP-09 como un candidato a ser sintetizado.

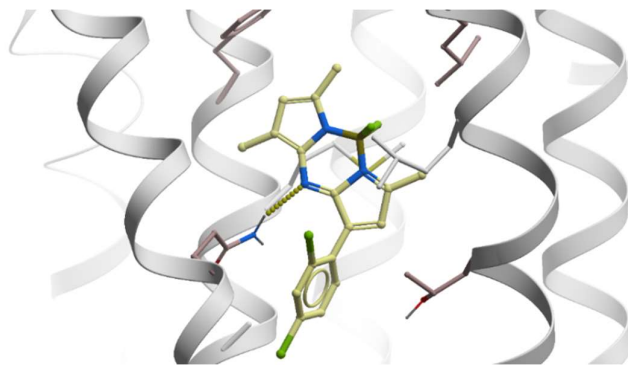


Figura 4.5. Pose de ABP-09 (átomos de C amarillos, N azules, F y Cl verdes) en el sitio de unión de antagonista de CRHR1 obtenida por *docking*. El puente hidrógeno entre ABP-09 y N283^{5,50} se representa con pequeñas bolas. Los aminoácidos clave en la interacción con ABP-09 se muestran como palos (átomos de O en rojo). Figura realizada por el Dr. Claudio Cavasotto.

2.2. Síntesis y caracterización de los compuestos de la ruta sintética

La ausencia de aza-BODIPYs con sustituyentes metilo en las posiciones 3, 5 y 7 en la literatura fue un indicio de que la síntesis de los mismos presenta dificultades apreciables. Zhao y Carreira (2006) demostraron que la presencia de grupos arilos en las posiciones 2 y 4 de uno de los pirroles es fundamental para obtener el producto deseado en la síntesis tradicional de aza-

BODIPYs asimétricos (la vía que implica la nitrosación de uno de los pirroles), e informan no haber obtenido siquiera trazas de aza-BODIPY cuando el pirrol sin nitrosar era el 2,4-Dimetilpirrol¹¹⁶. Por otro lado, Xin-Dong Jiang (2014) reafirmó la inexistencia de aza-BODIPYs con sustituyentes metilos en las posiciones 3 y 5, remarcando el requisito de la sustitución arílica en las posiciones 2 y 4 de los pirroles de partida¹¹⁸. Jiang a su vez señala la importancia que tendría contar con aza-BODIPYs con metilos en las posiciones 3 y 5, ya que a través de una reacción de Knoevenagel se podría realizar una extensión del sistema de conjugación. Por su parte, Liras (2007) describió que al intentar nitrosar el 2,4-dimetil-3-etilpirrol y formar un aza-BODIPY *in situ* por reacción con el mismo pirrol sin nitrosar y la posterior coordinación con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, obtuvo un 3-amino-BODIPY isómero del aza-BODIPY buscado¹¹⁷. Adjudicó este resultado a un proceso redox en el cual el pirrol nitrosado sufre la reducción del grupo nitro a amino, en paralelo con una oxidación del metilo de la posición 2 a aldehído. Posteriormente, este producto reacciona con otra molécula de pirrol nitrosado para dar como lugar al dipirrometeno precursor del BODIPY (al que finalmente llega por reacción con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$). Por otro lado, Wang (2010-2012) observó una reacción análoga al intentar obtener el aza-BODIPY a través de la nitrosación de un pirrol con un metilo como sustituyente en posición 2¹⁸⁵.

La ruta sintética utilizada para la obtención de aza-dipirrometenos a través de la reacción entre una 4-Aril-5-nitro-butan-2-ona y un pirrol 2,4-disustituido en presencia de acetato de amonio a reflujo en solventes alcohólicos no fue explorada por otros grupos hasta el momento para la síntesis de aza-BODIPYs con alquilos en posiciones 3 y 5. Tampoco figuran trabajos en literatura que hayan usado esta ruta para la síntesis de aza-BODIPYs asimétricos. El grupo de O'Shea la ha utilizado para estudios mecanísticos demostrando la posibilidad de explotar esta ruta para síntesis de compuestos asimétricamente sustituidos en los anillos pirrólicos (2012, con diaril- γ -nitroacetona) y la empleó en la síntesis de aza-BODIPYs simétricos con metilos en las posiciones 1 y 7 (2013)^{125,126}.

Teniendo en cuenta el estado del arte y la ausencia de productos similares al ABP-09, se exploraron las dos vías mencionadas en los párrafos precedentes. A través de la ruta que involucra a 4-(2,4-Diclorofenil)-5-nitro-butan-2-ona y al 2,4-Dimetilpirrol fue posible llegar al producto deseado. La misma se presenta en la Figura 4.6^{125,126,134,135}. En la sección 4.2. del Capítulo 2 figuran los detalles experimentales de todas las síntesis y purificaciones realizadas, mientras que en el Apéndice I se presentan los espectros de masa y los de RMN ^1H y ^{13}C .

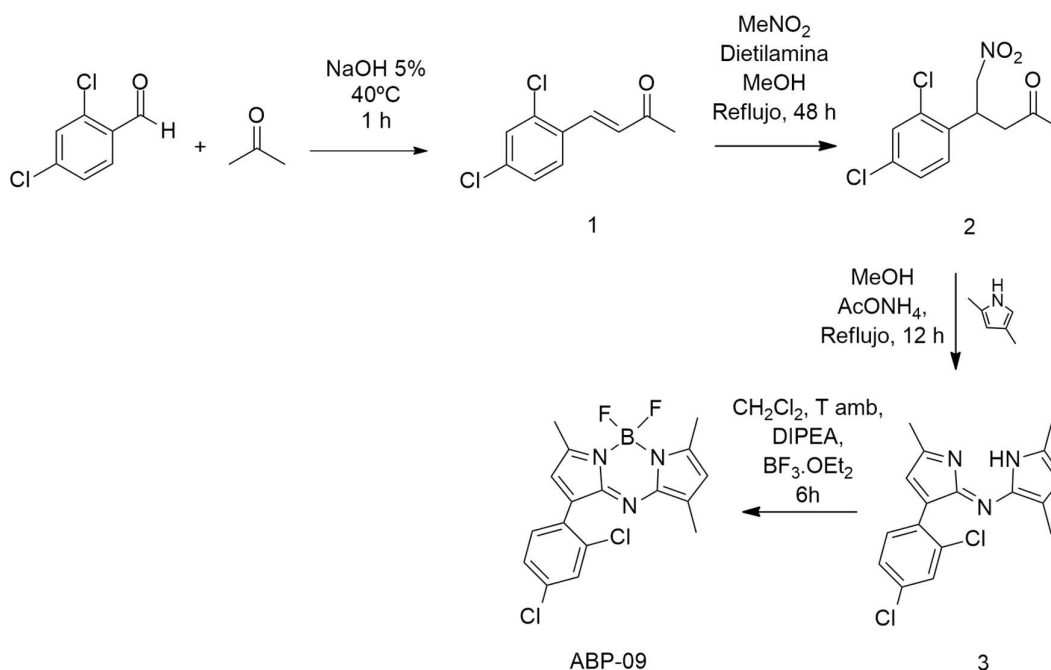


Figura 4.6. Ruta sintética utilizada para la obtención del aza-BODIPY ABP-09 (compuesto N°4).

Los rendimientos de las síntesis de **1** y **2** fueron de 78% y 88%, respectivamente. Por otro lado, la reacción que tiene como producto al compuesto **3** (que utiliza 2,4-dimetilpirrol adquirido comercialmente como uno de los reactivos) tuvo un rendimiento bajo, ya que se obtuvieron diversos productos en concentraciones comparables. En la Figura 4.7 se puede apreciar una placa de cromatografía de capa delgada, corrida en ciclohexano:acetato de etilo, 1:1, donde los distintos productos que revelan al UV (254 nm) fueron remarcados con un lápiz. Se pueden contar 12 productos a lo largo de la placa, junto a otros de mayor polaridad presentes en la siembra.



Figura 4.7. Placa de CCD correspondiente al producto de la reacción de formación del aza-dipirrometeno **3**.

Se realizó una purificación parcial del crudo de reacción por columna cromatográfica de sílica gel y se analizaron las distintas fracciones por inyección directa en un espectrómetro de masa de resolución unitaria (detector de cuadrupolo simple). La masa deseada, correspondiente a (Z)-3-(2,4-Diclorofenil)-N-(3,5-dimetil-2H-pirrol-2-iliden)-5-metil-1H-pirrol-2-amina (**3**) se halló en una fracción que incluía productos con RF entre 0,15 y 0,25, corriendo con ciclohexano:acetato de

etilo, 1:1. Esta misma fracción fue inyectada en un espectrómetro de masa de alta resolución (detector Q-TOF) y se obtuvo una masa exacta experimental igual a calculada (332,0721), así como también un patrón isotópico equivalente al simulado por el programa de análisis.

Entre los demás productos obtenidos, algunos pudieron ser identificados como los intermediarios que Grossi propuso al estudiar el mecanismo de este tipo de reacciones. En particular, se detectaron los productos 4-(2,4-Diclorofenil)-2-metilpirrol y 3-(2,4-Diclorofenil)-2-hidroxilamino-5-metilpirrol, ambos generados *in situ* y propuestos como intermediarios en dicho mecanismo. Esta observación, junto con la masa hallada correspondiente al aza-dipirrometeno, representan una evidencia de que el mecanismo propuesto por Grossi se cumplió en nuestro sistema de estudio. El mecanismo adaptado a nuestra reacción de estudio se presenta en la Figura 4.8.

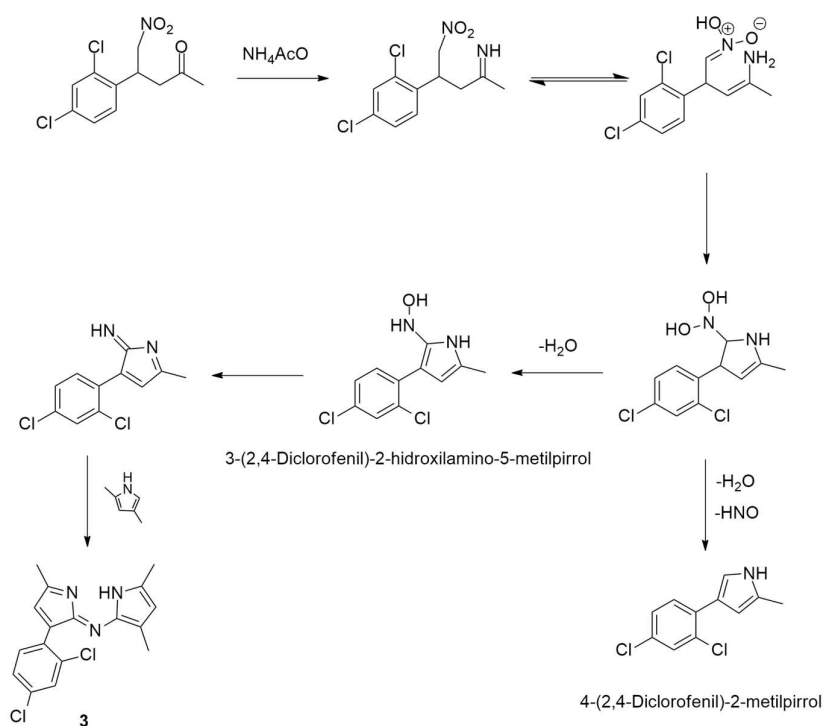


Figura 4.8. Mecanismo propuesto para la obtención del compuesto 3. Adaptado del trabajo de Grossi.

Debido a la gran cantidad de productos secundarios que dieron lugar a un bajo rendimiento de producción de aza-dipirrometeno, no fue posible purificar y aislar el compuesto aza-dipirrometeno. Por tal motivo, tampoco fue posible determinar el rendimiento de la reacción, aunque sí se pudo aproximar una cota superior del 10% (este sería el valor si toda la fracción recolectada fuese aza-dipirrometeno puro). Estos bajos rendimientos están de acuerdo con lo informado por Wu y O'Shea en su síntesis de aza-dipirrometenos con sustituyentes metílicos en

las posiciones 1 y 7 y arílicos en 3 y 5, donde los máximos rendimientos logrados fueron de 20-28%¹²⁶.

Teniendo en cuenta esto último y la baja estabilidad del aza-dipirrometeno (determinada por la disminución en la señal en el espectro de masa luego de una semana almacenado a -20°C y bajo nitrógeno), se prosiguió con el paso de reacción de coordinación del boro a los nitrógenos de los pirroles, utilizando como punto de partida la fracción impura. Esta reacción también dio lugar a diversos productos, algunos de los cuales revelaban en la placa de CCD por fluorescencia al ser excitados con una lámpara de 365 nm. Luego de purificar el producto de reacción por cromatografía en placa preparativa, se realizó una purificación adicional por HPLC. Posteriormente, fue posible identificar por espectrometría de masa una de las fracciones fluorescentes como ABP-09. Tanto el valor exacto de masa (377,0587) como el patrón isotópico experimentales coincidieron con los calculados (377,0584; Figura 4.9).

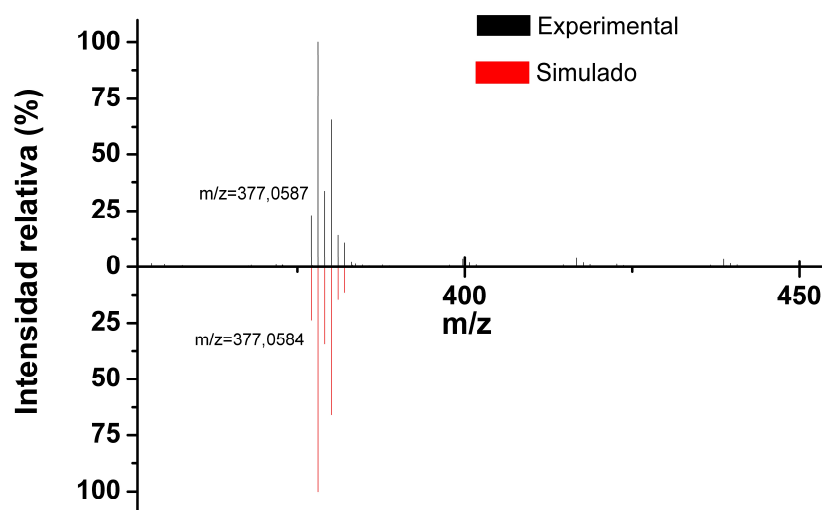


Figura 4.9. Espectro de masa experimental (rojo) y simulado (negro) de ABP-09.

La masa total de producto obtenida en este paso de síntesis fue del orden de los microgramos. Por tal motivo, no fue posible pesar el producto con exactitud y de ese modo determinar su coeficiente de absorción (ϵ). Alternativamente, se utilizó un valor de ϵ estimado para conocer en forma aproximada la masa obtenida y las concentraciones de las soluciones preparadas a partir del sólido. Considerando que los valores de ϵ de distintos BODIPYs y aza-BODIPYs con similar estructura o espectro de absorción que ABP-09 se encuentran alrededor de

70.000 M⁻¹cm⁻¹, este fue el valor escogido para realizar los cálculos de concentración¹¹⁰. A su vez, la escasa masa de producto imposibilitó la obtención espectros de ¹H y ¹³C-RMN.

Este rendimiento extremadamente bajo está de acuerdo con lo informado en literatura, donde los últimos artículos que revisan el estado del arte señalan que los intentos por obtener aza-BODIPYs con alquilos en las posiciones 3 y 5 han fracasado^{109,117,186}. Sin embargo, en estos casos se ha abordado la síntesis desde la vía que incluye la nitrosación de uno de los pirroles a través de NaNO₂, siendo el nitroso-pirrol un intermediario clave para la obtención de isómeros indeseados. En el presente trabajo, la vía que dio lugar al producto deseado no utilizó NaNO₂, sino NH₄AcO. El estudio mecanístico de esta reacción, desarrollado por Grossi, desestima la formación del nitroso-compuesto dadas las condiciones experimentales utilizadas (ausencia de agentes nitrosantes)¹²⁵.

La vía de la nitrosación, al igual que en los casos citados donde se buscó sintetizar aza-BODIPYs con sustituyentes alquílicos en las posiciones 1, 3, 5 y 7, no permitió obtener el compuesto deseado. A continuación, se describen los pasos seguidos en dicha vía.

En la Figura 4.10 se presenta la ruta sintética diseñada para la obtención de 4-(2,4-Diclorofenil)-2-metilpirrol (**2a**), una de las partes necesarias para la posterior formación de aza-dipirrometeno^{123,126,134,135}. El rendimiento de síntesis **2a** a partir de **2** fue 59%.

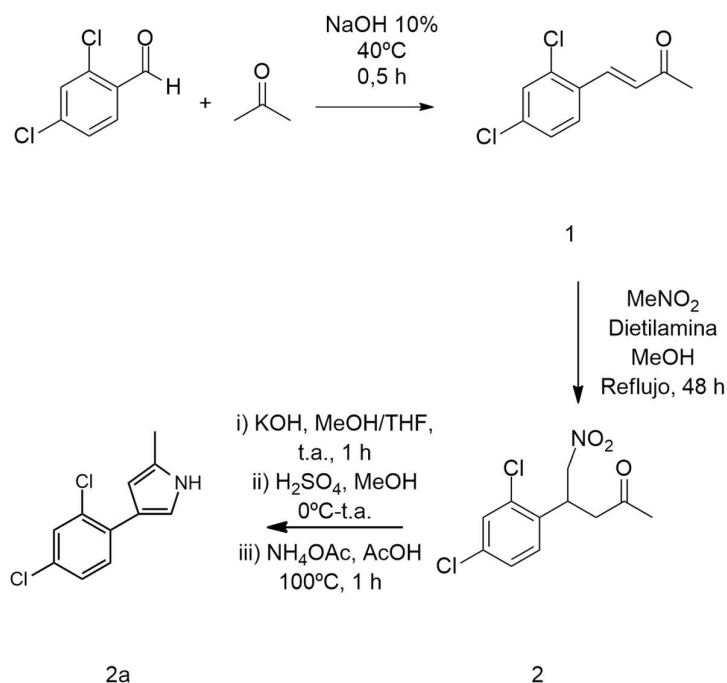


Figura 4.10. Ruta sintética utilizada para la obtención de 4-(2,4-Diclorofenil)-2-metilpirrol.

Una vez obtenido **2a**, se llevó a cabo el intento de nitrosación utilizando NaNO_2 y HCl 2% en etanol, para finalmente condensar ambos pirroles a través de un puente *aza* utilizando una mezcla de anhídrido acético y ácido acético a 100°C . Los intentos para nitrosar tanto el pirrol **2a** como el 2,4-Dimetilpirrol fueron insatisfactorios, ya que no se pudo detectar por RMN ni espectrometría de masa ninguno de los dos productos de manera reproducible. De este modo, si bien se buscó optimizar las condiciones de síntesis, esta vía fue descartada (Figura 4.11). Este resultado concuerda con el intento fallido de Liras al tratar 2,4-Dimetilpirrol con NaNO_2 , $\text{HAcO}/\text{Ac}_2\text{O}$ (100°C) y posteriormente con $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ y Et_3N en diclorometano (temperatura ambiente), donde obtuvo solamente 2-Acetil-3,5-dimetilpirrol y otros productos minoritarios.

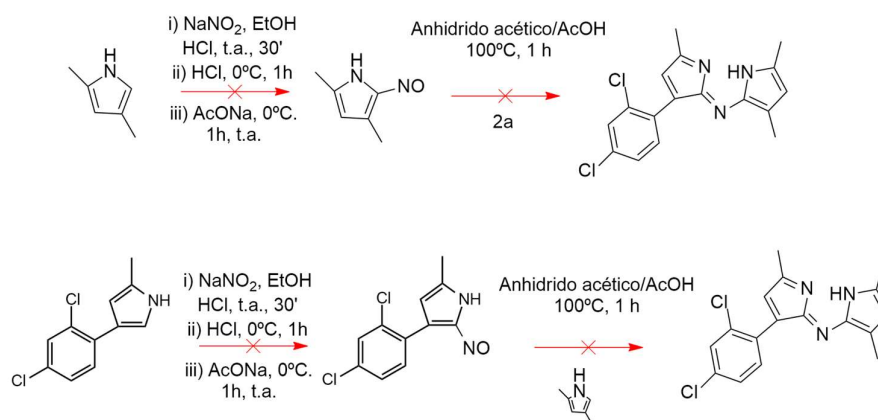


Figura 4.11. Esquema de la síntesis para la obtención del aza-dipirrometeno por la vía de la nitrosación. No se obtuvieron los productos deseados.

2.3. Caracterización fotoquímica y fotofísica de ABP-09

ABP-09 presenta su máximo de absorción en la región de 518-535 nm, con una moderada dependencia de la posición con la polaridad del solvente. Por otro lado, el espectro de emisión posee su valor máximo en la región de 545-550 nm, presentando una menor variación al modificar la polaridad del solvente. En la Figura 4.12 se presentan los espectros de absorción, emisión y excitación medidos en diclorometano a 25°C .

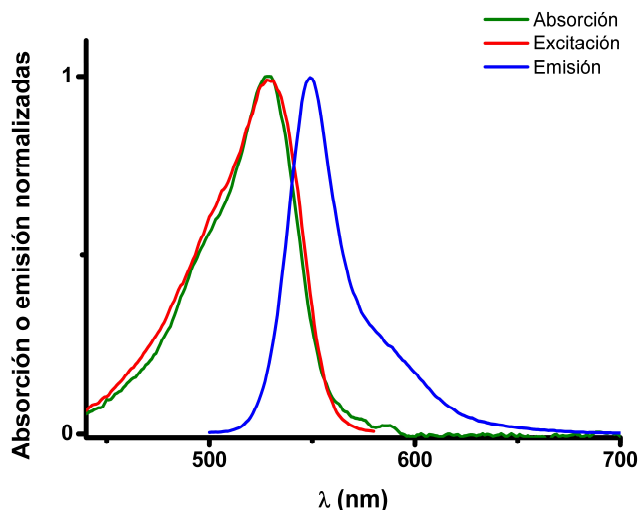


Figura 4.12. Espectros de absorción, excitación ($\lambda_{\text{em}}=590$ nm) y emisión ($\lambda_{\text{exc}}=490$ nm) normalizados del ABP-09 en diclorometano a 25°C.

Dada la ausencia de aza-BODIPYs similares a ABP-09, no fue posible realizar una comparación directa de las propiedades espectroscópicas con compuestos análogos. Por un lado, la gran mayoría de aza-BODIPYs informados en literatura son 1,3,5,7-aril-aza-BODIPYs, presentando una conjugación extendida debida a los 4 sustituyentes arílicos. Estos compuestos presentan sus máximos de absorción y emisión por encima de los 650 nm¹¹⁰. Por otro lado, los aza-BODIPYs sintetizados por Wu, que poseen sustituyentes aromáticos solamente en las posiciones 3 y 5, tienen sus máximos de absorción entre 620 y 650 nm¹²⁶. A su vez, entre estos compuestos, el que tiene sus espectros desplazados a mayores energías es el que posee sustituyentes fenilos, mientras que los de menor energía tienen a su vez grupos dadores de densidad electrónica en la posición *para* de los sustituyentes aromáticos (p-MeOC₆H₄). Es importante destacar que la extensión de la conjugación a través de las posiciones 1 y 7 (como en el caso del ABP-09) es apreciablemente menor que cuando esto ocurre en las posiciones 3 y 5 para compuestos de tipo BODIPY, como demostró Leen al explorar en 2011 por primera vez el efecto de la sustitución con grupos aromáticos en posiciones 1 y 7¹¹⁴. Leen observó que la di-aril-sustitución da lugar en ocasiones a corrimientos de solamente 10 nm, como es el caso de 1,7-Difenil-2,3,5,6-tetrametil-4,4-difluoro-4-bora-3*a*,4*a*-diazas-indaceno, cuyo máximo de absorción se encuentra en 538 nm y es insensible a la polaridad del solvente, mientras que su análogo con dos metilos en las posiciones 1 y 7 tiene su máximo en 528 nm en etanol. Contrariamente, cuando la doble sustitución arílica se da en las posiciones 3 y 5, el corrimiento puede ser cercano a los 50 nm (en el caso de 4,4-Difluoro-8-(4-iodofenil)-3,5-difenil-4-bora-3*a*,4*a*-diazas-indaceno, el máximo de absorción se encuentra en 558 nm –Burghart-, mientras que en el caso su análogo sustituyentes metilo en 3 y 5, el máximo está en 512 nm –Wagner-) ^{112,187}. Si el grupo aromático

tiene sustituyentes dadores de electrones en posición *para*, el efecto es aún mayor (hasta 75 nm). Finalmente, es necesario remarcar que en algunos casos donde se compararon los BODIPYs con sus aza-BODIPYs análogos, se observaron corrimientos al rojo. En particular, Karlsson determinó un corrimiento de aproximadamente 70 nm para un aza-BODIPY 3,5-aril-sustituido en comparación con su BODIPY análogo¹¹⁵.

El ABP-09 es un aza-BODIPY que posee una única sustitución aromática y la misma se encuentra en la posición 1. A su vez, dicho grupo aromático posee dos sustituyentes en posiciones *orto* y *para* que son aceptores de densidad electrónica (cloruros), y por lo tanto generan un menor corrimiento batocrómico de la banda de absorción que un aromático sin sustituyentes o con dadores de electrones. Por otro lado, la sustitución en *orto* genera un ángulo diedro elevado por impedimento estérico entre el Cl y el N del puente *aza*, que se opone a la extensión de la conjugación. Este efecto fue observado por Burghart para BODIPYs, al comparar el sustituyente p-MeOC₆H₄ con el o-MeOC₆H₄¹¹². En el primer caso, la disminución de la energía de la transición electrónica S₀→S₁ debida a la presencia del grupo electro-donor MeO se pudo comprobar al observar un corrimiento hacia el rojo 27 nm mayor al generado por el fenilo. Contrariamente, en el caso de la sustitución en *orto*, el aumento en el ángulo diedro debida al impedimento estérico entre MeO y el puente metino da como resultado un corrimiento hacia el rojo 9 nm menor que cuando el sustituyente es un grupo fenilo.

El compuesto tipo BODIPY con sustituyentes metilos en las posiciones 1,3,5,7 (nombrado como PM546 por López Arbéola) posee su máximo de absorción en 499 nm en ciclohexano¹⁸⁸. En caso de tener un sustituyente 2,4-diclorofenil en la posición 1 (dando lugar a un BODIPY comparable con el ABP-09), la posición del máximo no debería variar apreciablemente, por tener grupos electro-atractores en posiciones *orto* y *para*, y por ser la posición 1 poco sensible para la extensión de la conjugación por sustitución arílica. Por lo tanto, podemos concluir que el corrimiento batocrómico observado para el ABP-09 (mayor a 35 nm con respecto a un BODIPY similar, en solventes poco polares como ciclohexano) se debe a la presencia del puente *aza*.

En la Figura 4.13 se presenta el decaimiento del tiempo de vida del ABP-09 en acetonitrilo. El mismo es de tipo monoexponencial, con un tiempo de vida característico, τ , de (3,87 ± 0,04) ns. El compuesto PM546, utilizado para comparar al ABP-09 con un BODIPY similar, tiene un τ de 5,2 ns. Al observar la comparación hecha por Karlsson entre un aza-BODIPY y su BODIPY análogo, se puede ver que el primero tiene un tiempo de vida de 4,3 ns mientras que el segundo 6,6 ns, siendo consistente esta variación con la que se observó entre ABP-09 y PM546¹¹⁵. Esta disminución del

tiempo de vida se puede explicar por el aumento del coeficiente de absorción de los aza-BODIPYs con respecto a los BODIPYs similares.

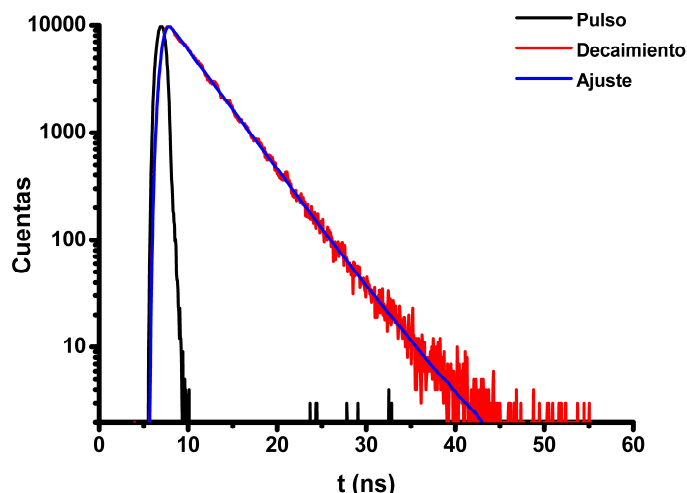


Figura 4.13. Decaimiento del tiempo de vida del ABP-09 en acetonitrilo a 25°C.

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) de ABP-09 fue medido por el método relativo, utilizando como referencia la Rhodamina 6G (R6G). En la Ecuación 4.2 se presenta la fórmula utilizada.

$$\Phi_{FM} = \Phi_{FR} \frac{(1-10^{-A_R})n_M^2 \int I_{FM}(\lambda)d\lambda}{(1-10^{-A_M})n_R^2 \int I_{FR}(\lambda)d\lambda} \quad [4.2]$$

Ecuación 4.2. Ecuación del método indirecto para la determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia. R representa a la referencia y M al compuesto a determinar (muestra). A es la absorbancia medida a la longitud de onda de excitación de los espectros de fluorescencia (la misma para ambos compuestos), I la intensidad de fluorescencia, n los índices de refracción, y los límites de la integral son tales que deben incluir el espectro de emisión completo.

En metanol el valor obtenido fue de 0,78, mientras que en cloruro de metileno se obtuvo 0,86. Estos valores son similares al Φ_F de PM546, que es 0,77 en ciclohexano. Esta similitud fue observada también en la comparación que hizo Karlsson, donde prácticamente no hubo variación entre el rendimiento cuántico de fluorescencia del BODIPY con respecto al aza-compuesto análogo (0,92 vs. 0,95). En la Figura 4.14 se presentan los espectros experimentales obtenidos para la determinación del rendimiento cuántico para el caso de diclorometano. En el pie de figura se presentan los valores de absorbancia medidos a la longitud de onda de excitación utilizada en las determinaciones de fluorescencia. El espectro de R6G fue medido en metanol y se utilizó como referencia el rendimiento cuántico de fluorescencia informado por Magde para dicho solvente (0,93)¹⁸⁹.

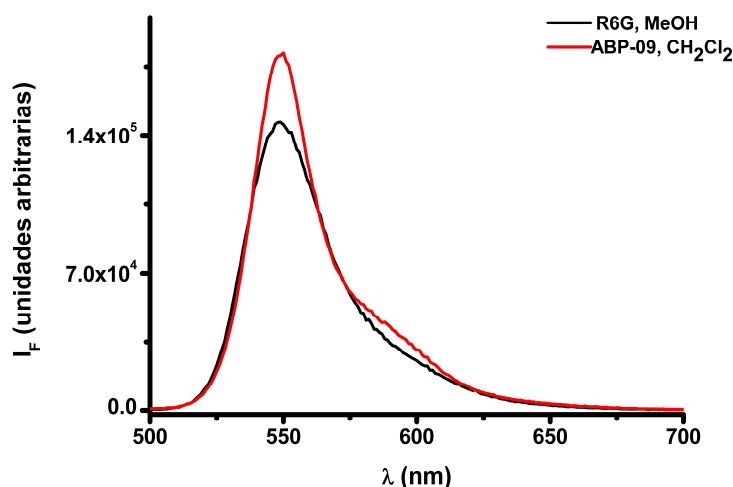


Figura 4.14. Espectros de emisión del ABP-09 y de R6G. Las áreas debajo de cada espectro fueron 7,30E6 y 6,63E6 respectivamente, mientras que las absorbancias fueron 0,057 y 0,042. En el cálculo final se utilizó $n_{\text{MeOH}}=1,3288$ y $n_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}=1,4244$.

En la Figura 4.15 se muestra la variación de los máximos de absorción y emisión (izquierda) y los corrimientos de Stokes (derecha), expresados en frecuencia, en función de los valores de $E_T(30)$ de distintos solventes. Los máximos corresponden al valor de absorción o emisión más alto del espectro crudo, sin mediar ningún ajuste o deconvolución espectral. Al observar el comportamiento solvatocrómico del ABP-09, se pudo determinar que la energía de las transiciones $S_1 \rightarrow S_0$ (emisión) y $S_0 \rightarrow S_1$ (absorción) aumenta al incrementar la polaridad del solvente. Este efecto fue mayor para la absorción que para la emisión. Las observaciones recién descriptas se corresponden con un solvatocromismo negativo, en el cual hay una mayor estabilización del estado fundamental comparado con el excitado al aumentar la polaridad del solvente.

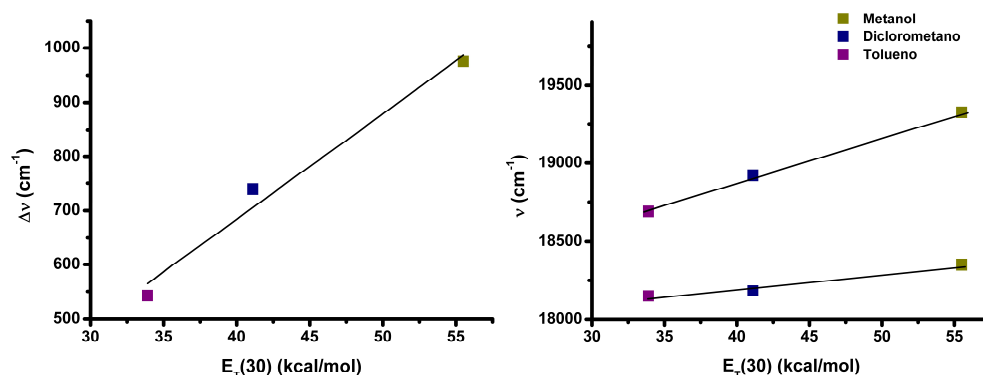


Figura 4.15. Izquierda: Variación de los máximos de absorción y emisión para solventes de distinta polaridad (representados por su valor de $E_T(30)$). Derecha: Variación del corrimiento de Stokes, para los mismos solventes.

Este comportamiento no es usual para los aza-BODIPY tetra-aril-sustituídos, cuyos espectros de absorción y emisión suelen ser insensibles a la polaridad del solvente¹¹⁰. Existe una gran cantidad de BODIPYs informados en literatura con capacidad de realizar una transferencia de carga en el estado excitado, que a su vez poseen comportamiento solvatocrómico. Sin embargo, estos compuestos poseen un solvatocromismo positivo, ya que el estado excitado (S_1) se estabiliza más que el fundamental (S_0) en solventes polares. Por su parte, Gut estudió recientemente el solvatocromismo de algunos aza-BODIPYs tetra-aril sustituidos, pudiendo determinar un solvatocromismo negativo, con corrimientos de hasta 15 nm en los máximos de absorción al pasar de tolueno a acetonitrilo, siendo menor el efecto sobre los máximos de emisión¹⁹⁰.

En la Tabla 4.2 se presenta un resumen de las propiedades espectroscópicas de ABP-09.

	$\lambda_{\text{max,abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max,F}}$ (nm)	Φ_F	τ (ns)	Corrimiento Stokes (cm^{-1})
Metanol	517,5	545	$0,78 \pm 0,03$	-	975
Acetonitrilo	517	544	-	$3,91 \pm 0,02$	960
Diclorometano	528,5	550	$0,86 \pm 0,04$	$3,84 \pm 0,02$	739
Tolueno	535	551	-	-	542

Tabla 4.2. Resumen de propiedades espectroscópicas medidas para el ABP-09.

2.4. Estudio del efecto como antagonista del ABP-09 en línea celular HT22-CRHR1

La evaluación de la actividad como antagonista del ABP-09 se realizó en conjunto con la Lic. Natalia G. Armando, bajo la supervisión de la Dra. Susana Silberstein en las instalaciones del IBioBA-MPSP-CONICET. En particular, se estudió el efecto de ABP-09 en la producción del segundo mensajero cAMP en respuesta al estímulo con CRH, así como también la activación de dos componentes moleculares clave río abajo: Akt y ERK1/2 (ambos se fosforilan al activarse en respuesta al estímulo con CRH en células que expresan CRHR1). La cuantificación de cAMP se realizó a través del biosensor de FRET basado en Epac, mientras que pAkt y pERK1/2 se cuantificaron mediante la técnica de *Western blot*. En todos los casos donde se utilizó el ABP-09, las células fueron pre-incubadas con el mismo 20 horas antes de evaluar la respuesta celular ante el estímulo con CRH. Este tiempo de pre-incubado se determinó luego de haber tratado células HT22-CRHR1 con ABP-09 en dos concentraciones diferentes (10 nM y 100 nM) y haber observado la variación temporal de la fluorescencia a lo largo de 24 horas en un microscopio fluorescencia de campo amplio. Se pudo apreciar que luego de un aumento inicial pronunciado a tiempos cortos en la fluorescencia total en las células (mayor para [ABP-09] = 100 nM que para 10 nM), esa emisión decae a tiempos largos (>12 horas) a un valor constante que no depende de la

concentración inicial. La emisión estacionaria observada a tiempos prolongados, al ser independiente de la cantidad de ABP-09 agregado, tiene con mayor probabilidad la característica de una asociación específica del colorante, ya sea a CRHR1 como a otros componentes celulares. Teniendo esto en cuenta, en los distintos experimentos se realizaron tratamientos de 20 h con ABP-09. En la Figura 4.16 se puede apreciar la variación de la emisión dentro de las células en función del tiempo.

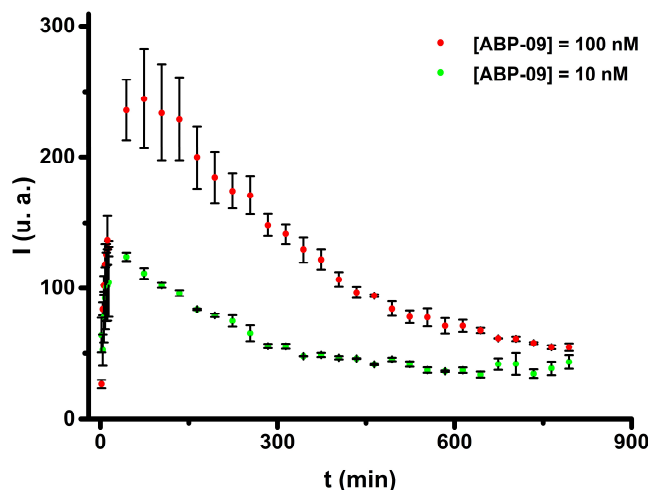


Figura 4.16. Variación de la fluorescencia en función del tiempo para células HT22-CRHR1 luego de haber agregado ABP-09 en concentraciones 10 nM y 100 nM. Se muestran las primeras 13 h.

En la Figura 4.17 se presentan los resultados obtenidos en la cuantificación de pAkt y pERK1/2. Para ambos casos, se muestra el promedio de tres experimentos independientes (gráfico de barras) y un ejemplo de un gel revelando la cantidad de proteína total y de proteína fosforilada. En el panel A se puede apreciar que el ABP-09 logró disminuir significativamente la activación de la vía de ERK1/2 en el tiempo correspondiente al máximo nivel de activación de la misma (a los 5 minutos de haber estimulado las células con CRH 100 nM). Este resultado se obtuvo para las dos concentraciones del ABP-09 utilizadas (100 nM y 1 μ M), siendo ambas respuestas de similar magnitud (cerca de un 25% menor a la del control). La diferencia con el control se estudió a través de un ANOVA de dos factores seguido por test de Bonferroni, obteniendo un p-valor<0,001. Por otro lado, en el panel B se puede ver que el ABP-09 causa también una respuesta menor al de las células control en la vía de Akt 30 minutos después de haber estimulado con CRH 100 nM. En este caso, la merma en la respuesta celular fue significativa solamente para una concentración del ABP-09 de 1 μ M, dando un p-valor<0,05 al realizar el ANOVA de dos factores y test de Bonferroni. A su vez, en la figura se puede apreciar que los errores experimentales obtenidos en la medición de pAkt fueron mayores que en el caso de pERK1/2.

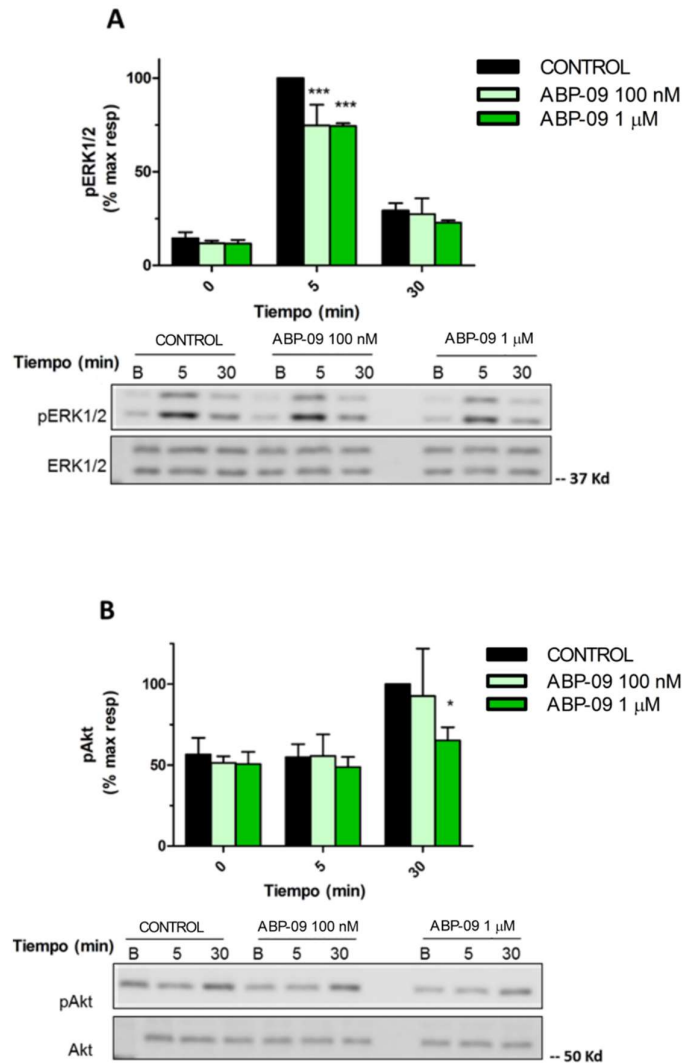


Figura 4.17. A: Cuantificación de pERK1/2 para células tratadas con distintas concentraciones del ABP-09 y células tratadas solo con DMSO (Control). Los valores de pERK1/2 que se presentan en el gráfico de barras son relativos a la cantidad de ERK1/2 total. Se toma como 100% la máxima respuesta, que corresponde en este caso a los 5 minutos de estímulo con CRH (100 nM) para las células control. El gel muestra a modo de ejemplo el revelado tanto de pERK1/2 como de ERK1/2 (total) para una corrida. B: Cuantificación de pAkt al estimular con CRH 100 nM. El tratamiento de datos es equivalente al realizado para pERK1/2. El 100% corresponde a la respuesta del control a los 30 minutos. Ambos experimentos se realizaron por triplicado (n=3).

El efecto del aza-BODIPY sobre la liberación de cAMP ante el estímulo con CRH 10 nM se presenta en la Figura 4.18. En el panel A se puede apreciar que la respuesta de cAMP, medida por la disminución de FRET, es menor en las células pre-tratadas con el ABP-09 que en los controles. A su vez, se aprecia una respuesta similar para concentraciones 10 nM y 100 nM de ABP-09. Si bien el efecto inhibitorio en estos experimentos se obtuvo con concentraciones de ABP-09 menores que las utilizadas en los experimentos de *Western blot*, la concentración de estímulo también lo fue, siendo de este modo esperable una inhibición con menor cantidad de antagonista. Por otro lado, la técnica utilizada en la cuantificación de cAMP posee una mayor sensibilidad que

las determinaciones por *Western blot*. En el panel B se presenta el efecto del antagonista comercial CP-376395 (CP). Se puede ver que su respuesta fue similar, en magnitud y tiempo de respuesta, a la del ABP-09.

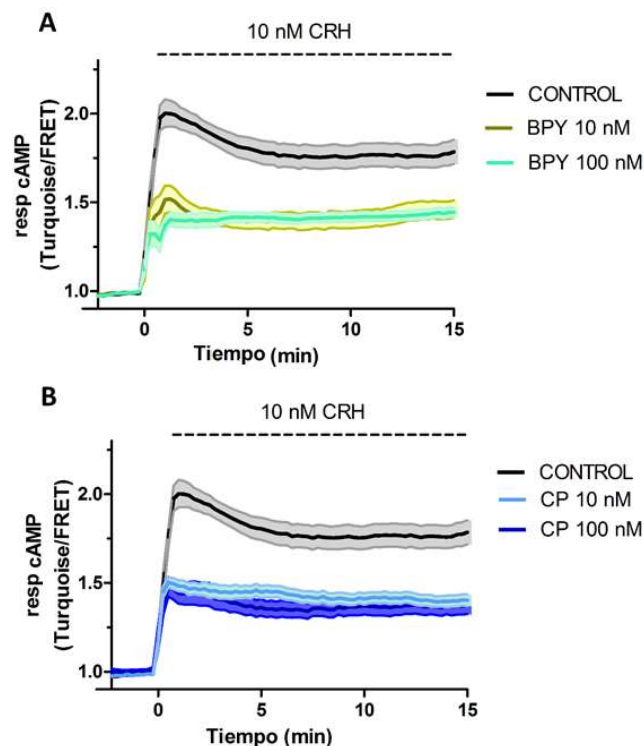


Figura 4.18. Respuesta cAMP ante el estímulo de CRH 10 nM medida en células HT22-CRHR1-Epac-S¹⁸⁷. La línea sólida representa el valor promedio y la zona sombreada delimita el error experimental, calculado como el desvío estándar. El número de células estudiadas varía entre 14 y 25 por condición. A: Células pre-incubadas con ABP-09 durante 20 h en las concentraciones señaladas. B: Células pre-incubadas 20 h con el antagonista comercial CP-376395 (CP).

Los resultados de estudiar el efecto del ABP-09 sobre la actividad de CRHR1 cuando es estimulado por su ligando natural, CRH, permiten concluir que ABP-09 disminuye la respuesta del receptor. A su vez, no se observó una alteración del comportamiento basal ni del tipo de respuesta en las células tratadas, pudiendo decir por tal motivo que ABP-09, tras permanecer 20 horas dentro de las células, no modificó las funciones celulares en forma significativa. Por otro lado, se cuantificó una actividad inhibitoria comparable a la del antagonista comercial con el cual fue cristalizado el receptor en 2013¹⁰⁷. De este modo, se puede concluir que el ABP-09 se comporta como un antagonista del receptor CRHR1.

2.5. Microscopía de súper-resolución: desempeño de ABP-09 en STORM y determinación de su afinidad por CRHR1

2.5.1. Desempeño de ABP-09 en microscopía de súper-resolución

Una vez caracterizadas las propiedades espectroscópicas de ABP-09 y habiendo comprobado en ensayos biológicos su actividad como antagonista, se evaluó su desempeño en microscopía de súper-resolución, así como también su afinidad por CRHR1. La nanoscopía utilizada en estos estudios fue STORM.

En la Figura 4.19 se presentan dos imágenes de STORM obtenidas en células HT22-CRHR1, marcadas con ABP-09 y AlexaFluor647 (ver sección 4.5 del Capítulo 2). Se utilizó la menor concentración del ABP-09 en la cual se observó un efecto en los experimentos biológicos con el objetivo de minimizar la marcación inespecífica. El canal verde corresponde a la emisión del ABP-09, el rojo a la del AlexaFluor647 y el color amarillo representa la superposición de ambos canales. A la izquierda se pueden ver las dos células y sus respectivos contornos, mientras que a la derecha se presenta un acercamiento correspondiente a las zonas marcadas en los recuadros color cian. En las imágenes de la derecha se pueden apreciar detalles con una resolución apreciablemente menor al límite dado por la difracción (la barra es de 500 nm).

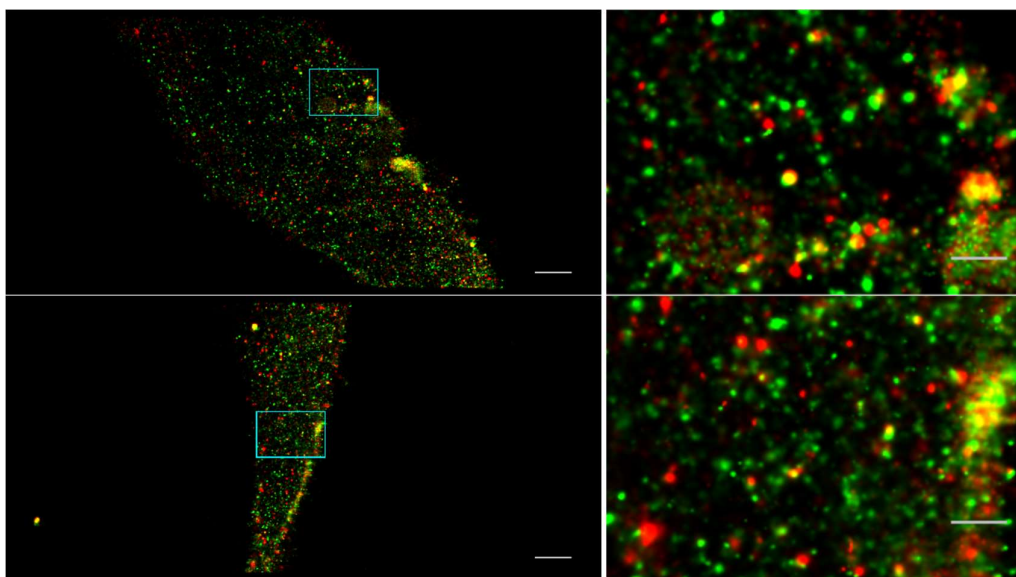


Figura 4.19. Imágenes de STORM en células HT22-CRHR1. El canal verde corresponde al ABP-09, mientras que el rojo a AlexaFluor647 (inmonomarcación del receptor). En las imágenes de la izquierda se muestra una célula individual por imagen y la barra representa 2 μ m. En las de la derecha se muestra un acercamiento en las zonas correspondientes a los recuadros color cian de las imágenes de la izquierda, y la barra es de 500 nm.

Un primer punto de análisis está relacionado al desempeño de ABP-09 en este tipo de microscopías. Para ello, se realizó una comparación entre la precisión de localización lograda con

él y con AlexaFluor647 (uno de los fluoróforos más utilizados en STORM). Esta comparación parte de haber utilizado intensidades de excitación similares en los láseres de 532 nm y 642 nm (entre 5 y 7 kW/cm²) y de haber logrado una densidad de moléculas encendidas por cuadro baja en ambos canales. En la Figura 4.20 se puede apreciar un cuadro de los 20.000 obtenidos en la adquisición de la imagen de STORM de la segunda célula de la Figura 4.19 (canal verde). En este cuadro se localizaron cinco puntos brillantes, representadas por cruces rojas. Considerando que el área ocupada por la célula fue aproximadamente 60 μm^2 , se obtiene una densidad de 0,083 moléculas/ μm^2 . En estas condiciones, la probabilidad de tener dos localizaciones a una distancia menor a lo que determina el límite de resolución de Abbe es extremadamente baja, y por lo tanto cada localización es asignable a una única molécula. A su vez, como puede verse en la Figura 4.21, cerca del 90% de las moléculas muestran un tiempo de encendido menor o igual al tiempo de exposición (30 ms, correspondiente también a la duración de cada cuadro). Estas condiciones, que se cumplieron para los dos colorantes, son necesarias para la adquisición de imágenes de STORM.

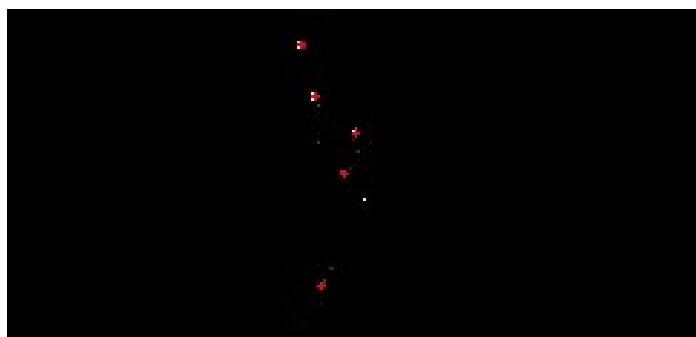


Figura 4.20. Cuadro n°6397, dentro de la secuencia de 20000 cuadros obtenidos en la adquisición de la imagen de STORM de la segunda célula de la Figura 4.19 (canal verde). Las cruces representan el centro de cada localización.

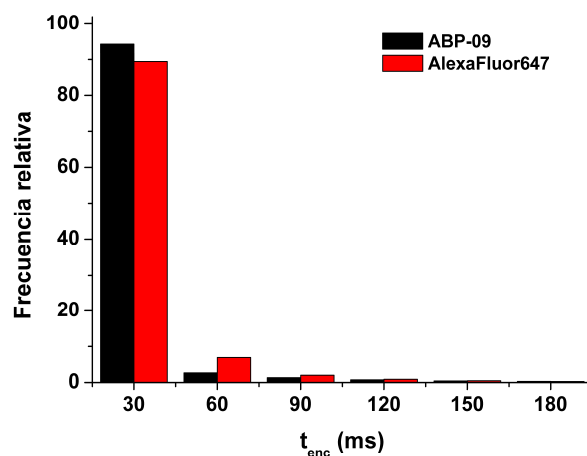


Figura 4.21. Histograma de tiempos de encendido para ABP-09 y AlexaFluor647 en células HT22-CRHR1.

En la Figura 4.22 se presentan los histogramas de precisión de localización obtenidos con el programa de análisis para los dos colorantes. Este parámetro es de gran relevancia, ya que la confianza en las posiciones de las localizaciones, y por lo tanto cualquier análisis que se pueda hacer sobre las imágenes de STORM, están determinadas por la precisión alcanzada. *ThunderSTORM* calcula esta precisión a través de la Ecuación 4.3, donde σ es el desvío estándar de la función gaussiana a través de la cual el programa ajusta la localización en el plano XY, a es el tamaño de píxel en nm (13,3 nm en este caso), N el número de fotones detectados provenientes de la molécula y b el nivel de señal de fondo. Se puede ver que esta ecuación es análoga a la Ecuación 1.1 (Capítulo 1).

$$\langle\langle\Delta x\rangle^2\rangle = \frac{\sigma^2 + \frac{a^2}{12}}{N} + \frac{8\pi\sigma^4 b^2}{N^2 a^2} \quad [4.3]$$

Ecuación 4.3. Ecuación utilizada por el programa *ThunderSTORM* para calcular la precisión de las distintas localizaciones. N es el número de fotones detectados provenientes de la molécula, σ el desvío estándar de la gaussiana que ajusta la localización en XY, a el tamaño de píxel en nm y b la señal de fondo.

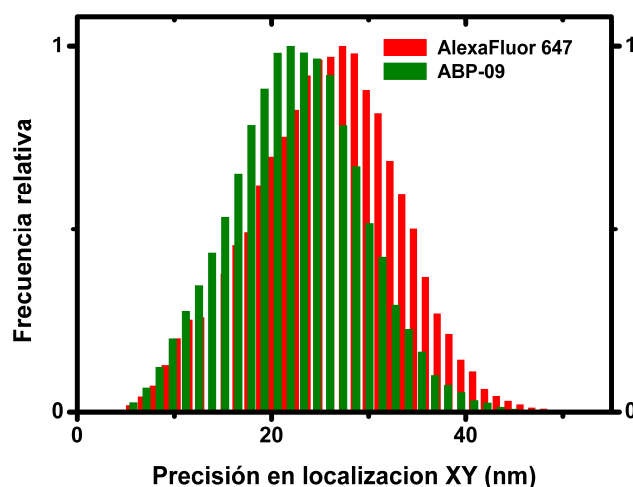


Figura 4.22. Histogramas de la precisión de localización para el ABP-09 (verde) y para AlexaFluor647 (rojo). Los valores de media y desvío estándar son 23 nm y 7 nm para el ABP-09, y 26 nm y 7 nm para AlexaFluor647. El número de localizaciones tenidas en cuenta son 71324 (ABP-09) y 64284 (AlexaFluor647).

Observando la Figura 4.22, se puede ver que la precisión de localización de ABP-09 y de AlexaFluor647 son muy similares (media de 23 nm, en comparación con 26 nm de AlexaFluor647). Teniendo en cuenta que AlexaFluor647 posee un excelente desempeño para esta técnica y que es uno de los principales fluoróforos utilizados en la misma, se puede concluir que el ABP-09 es también una muy buena sonda fluorescente para ser utilizada en STORM. Este resultado se debió a que ABP-09 posee un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia, lo cual le permite otorgar un gran número de fotones por molécula, y a su capacidad de habitar estados oscuros en las condiciones de adquisición, manteniendo una densidad muy baja de fluoróforos encendidos por

cuadro. De este modo, se minimizó $\langle \Delta x \rangle^2$ al aumentar N y disminuir la señal de fondo, y se garantizó la detección de moléculas individuales. Finalmente, a partir de este análisis, se aplicó en cada imagen de STORM un filtro para trabajar únicamente con las localizaciones cuya precisión fuera menor a 30 nm, y de ese modo excluir de los análisis las localizaciones menos precisas, sin por ello perder una cantidad de información significativa.

2.5.2. Determinación de afinidad entre ABP-09 y CRHR1

Se realizó un estudio de afinidad entre ABP-09 y CRHR1 (marcado con AlexaFluor647) a partir de un análisis de cercanía entre las distintas moléculas. Gracias a la elevada precisión de las localizaciones en las imágenes de súper-resolución, fue posible estudiar proximidades en el orden de los 15-30 nm. Por otro lado, la utilización de iluminación TIRF permitió minimizar la señal de fondo ya que solamente se excitaban las moléculas que se encontraban a menos de 200-300 nm del vidrio sobre el que crecieron las células.

La cuantificación de la afinidad entre el antagonista y el receptor se realizó contabilizando las moléculas de antagonista unidas al receptor y estableciendo posteriormente un cociente entre el número de pares antagonista-receptor y el producto del número de antagonistas y receptores libres. Este cociente se comparó con el obtenido para una distribución aleatoria y a través de una calibración se obtuvo una constante de afinidad. Posteriormente se realizó un análisis de la distribución de primeros vecinos y se compararon los resultados obtenidos con los correspondientes a distribuciones simuladas a partir de las constantes de afinidad obtenidas con el primer método. A continuación, se describen ambas metodologías en detalle.

2.5.2.1. Determinación de la constante de equilibrio de afinidad a nivel de célula individual

Si se observa con detenimiento la Figura 4.19, se pueden encontrar zonas de mayor colocalización (amarillo), así como también regiones donde prevalece o bien el color verde (ABP-09) o bien el rojo (AlexaFluor647). Para traducir esta observación en una determinación cuantitativa, fue necesario establecer un criterio para distinguir lo que está unido de lo que no. No se escogió como criterio la mera superposición de canales en la imagen de súper-resolución porque, si bien la precisión de localización del centro de la molécula es menor a 30 nm, lo que se grafica en la imagen de STORM es la función gaussiana que ajusta la emisión de la molécula y la misma tiene un ancho (σ) mayor a la precisión de localización. De este modo, si dos moléculas se encontrasen a 50 nm de distancia, existiría una superposición en la imagen de súper-resolución, pero a su vez sería posible distinguir que las mismas están suficientemente lejos como para no pertenecer al mismo receptor. Por lo tanto, el criterio escogido para determinar si dos moléculas

se encontraban unidas a un mismo receptor fue que se encontrasen a una distancia menor o igual a 18,80 nm. Este valor fue elegido considerando el tamaño de píxel (13,3 nm) y la precisión de localización (8-30 nm): moléculas cuyos centros de localización difiera en 1 píxel (13,3 nm) o $\sqrt{2}$ x píxel (18,80 nm) pueden corresponder a un mismo receptor y la diferencia deberse a un error aleatorio del método, mientras que distancias mayores o iguales a 2 píxeles (26,6 nm) se pueden determinar con precisión suficiente. Por lo tanto, se contabilizó como un evento de unión a un mismo receptor cada vez que los centros se encontraban o bien en el mismo píxel, o bien a una distancia menor a dos píxeles (entorno de los primeros 8 vecinos). En la Figura 4.23 se muestran a modo de ejemplo dos casos sustraídos de las imágenes presentadas en la Figura 4.19 donde hay un evento que fue contabilizado como unión a un mismo receptor (izquierda) y otro donde la distancia observada fue mayor a 18,80 nm y por lo tanto no se contabilizó como unión.

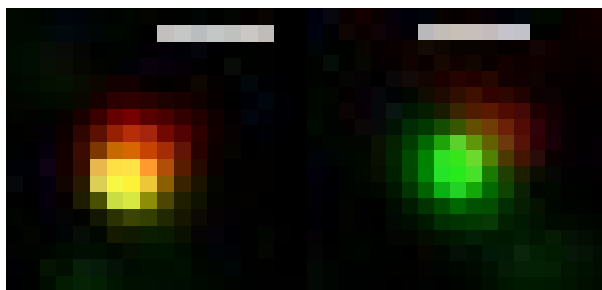


Figura 4.23. Ejemplos de eventos de colocalización (izquierda) y de no colocalización (derecha). Ambos fueron obtenidos de imágenes experimentales de STORM utilizando el ABP-09 y AlexaFluor647 en células HT22-CRHR1. La barra gris mide 100 nm.

Para contabilizar las uniones se escogieron varias regiones de 200 x 200 píxeles en el plano XY, cuya profundidad de campo fue de aproximadamente 200 nm debido a la iluminación TIRF ($2,66 \times 2,66 \times 0,2 \mu\text{m}^3$). Así, al analizar distintas zonas en una misma célula, se tuvo en cuenta la heterogeneidad en la distribución de receptores. Por otro lado, el estudio de distintas células permitió tener en consideración la variabilidad inter-celular.

Los cocientes Q_{AB} de cada región estudiada se calcularon según la Ecuación 4.4. Allí, N_{AB} representa el número de pares cruzados (ABP-09 con AlexaFluor647) contabilizados, mientras N_A y N_B son, respectivamente, la cantidad de moléculas de AlexaFluor647 y de ABP-09 libres. Se consideró como moléculas libres a aquellas que no tuvieran vecinos de ningún tipo a distancias menores de 26,6 nm (2 píxeles). A su vez, para cuantificar los pares cruzados se consideraron las moléculas de ABP-09 que tuvieran un número de vecinos de AlexaFluor647 mayor a la cantidad de vecinos homónimos y, de igual forma, los AlexaFluor647 que se encontrasen rodeados por más ABP-09 que moléculas de su misma identidad. Finalmente, las moléculas que estuviesen rodeadas mayormente por otras de su misma identidad, se contabilizaron como pares A_2 o B_2 . Por otro lado,

dado que siempre se trabajó con el mismo volumen ($2,66 \times 2,66 \times 0,2 \mu\text{m}^3$), se utilizó un cociente por unidad de volumen.

$$Q'_{AB} = \frac{Q_{AB}}{V} = \frac{N_{AB}}{N_A N_B} \quad [4.4]$$

Ecuación 4.4. Expresión del cociente Q'_{AB} . Q_{AB} es el cociente que relaciona N_{AB} con N_A y N_B —en forma análoga a una constante de equilibrio—, V el volumen de la región analizada, Q'_{AB} el cociente por unidad de volumen, N_{AB} es el número de pares AB contabilizados, y N_A y N_B son la cantidad de receptores (AlexaFluor647) y de ABP-09 libres.

El método de análisis utilizado no discierne los pares generados por una afinidad química real de aquellos obtenidos por una superposición estadística de moléculas libres. Los pares generados por superposición azarosa de ABP-09 y AlexaFluor647 libres tienen un mayor peso a concentraciones elevadas. Por este motivo, el cociente Q_{AB} no representa una constante de equilibrio real, sino que tiene un aporte aleatorio y uno químico, y varía con las concentraciones de reactantes.

En la Figura 4.24 se presenta el comportamiento observado al calcular $\log Q'_{AB}$ para distintas regiones celulares con diferentes densidades y se lo compara con el correspondiente a distribuciones aleatorias ($\log Q_{AB, \text{Alea.}}$). Se tuvieron en cuenta regiones de tres células distintas que recibieron el mismo tratamiento. Allí puede observarse que los valores de $\log Q_{AB, \text{Alea.}}$ calculados aumentan linealmente con la densidad. Por otro lado, se puede apreciar que $\log Q'_{AB}$ fue mayor que $\log Q_{AB, \text{Alea.}}$ para los mismos valores de densidad en todos los casos. De este modo, se puede concluir que existe una afinidad química verdadera entre ABP-09 y el receptor. Si bien se observa un aumento de $\log Q'_{AB}$ con la densidad, el mismo se puede explicar debido a la presencia de una componente aleatoria, tal como se explicó en el párrafo precedente. La existencia de una afinidad real está de acuerdo con la actividad como antagonista comprobada en los ensayos biológicos.

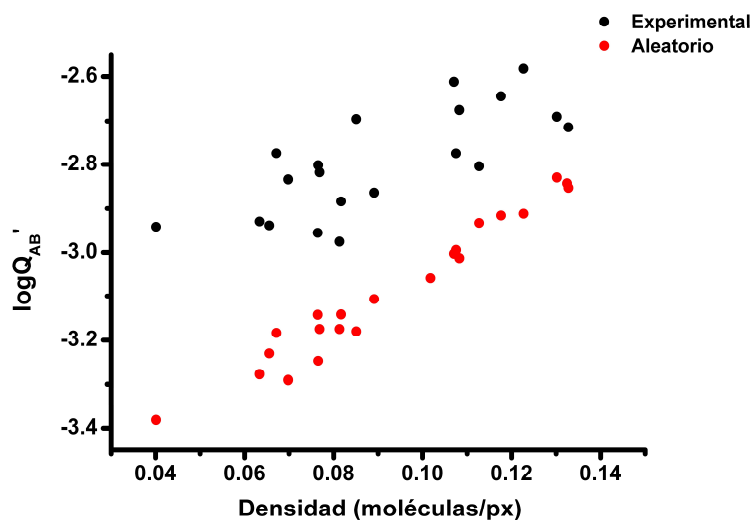


Figura 4.24. Variación de $\log Q_{AB}'$ en función de la densidad, para los casos experimental (negro) y aleatorio (rojo).

La detección de regiones donde ABP-09 se asocia con otras moléculas del mismo tipo, y el mismo fenómeno observado para los anticuerpos marcados con AlexaFluor647, dio lugar a un análisis de las asociaciones no cruzadas. En la Figura 4.25 se presentan los resultados. Se puede ver que la asociación entre moléculas de ABP-09 y entre anticuerpos marcados también es mayor a la que se hubiese hallado en una mera asociación aleatoria.

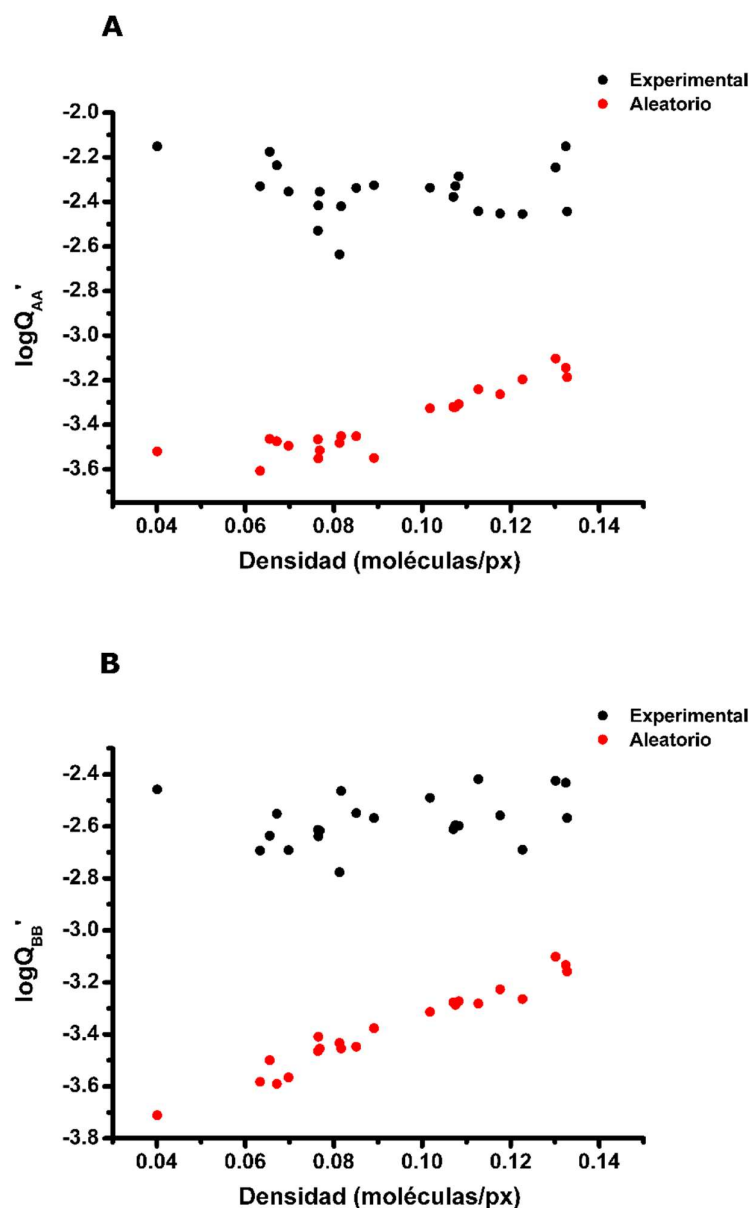


Figura 4.25. Variación de $\log Q'_{AA}$ (A) y $\log Q'_{BB}$ (B) en función de la densidad para los casos experimental y aleatorio.

El sistema está determinado por, al menos, tres constantes de equilibrio: K_{AB} , K_{AA} y K_{BB} . Por tal motivo, con el objetivo de encontrar una relación entre las constantes del sistema y los cocientes Q_{ij} calculados, se realizaron simulaciones de sistemas de densidad variable que cumplan con distintos K_{AB} , K_{AA} y K_{BB} . Posteriormente, en cada una de estas distribuciones se computaron los cocientes Q_{ij} , siguiendo los mismos criterios que fueron descriptos para las imágenes de microscopía. Los programas utilizados para estas simulaciones se encuentran disponibles en el Apéndice III.

En la Figura 4.26 se presenta la variación de $R_{Q_{AB}/Q_{AB,Alea}} = \log(Q_{AB}/Q_{AB,Alea})$ en función de la densidad para el caso experimental y para distintas simulaciones. Se escogió un intervalo de valores de K_{AB}' , K_{AA}' y K_{BB}' (constantes de equilibrio por unidad de volumen) que diese lugar a Q_{ij} simulados del mismo orden de magnitud que los obtenidos experimentalmente. Por simplicidad, se consideró $K_{AA}'=K_{BB}'$. En las distintas curvas se puede ver que, para las densidades correspondientes a los casos experimentales (0.04-0.14 moléculas/px), la variación de $R_{Q_{AB}/Q_{AB,Alea}}$ es baja, por lo cual se obtuvo un valor promedio representativo de cada sistema (Figura 4.26.B).

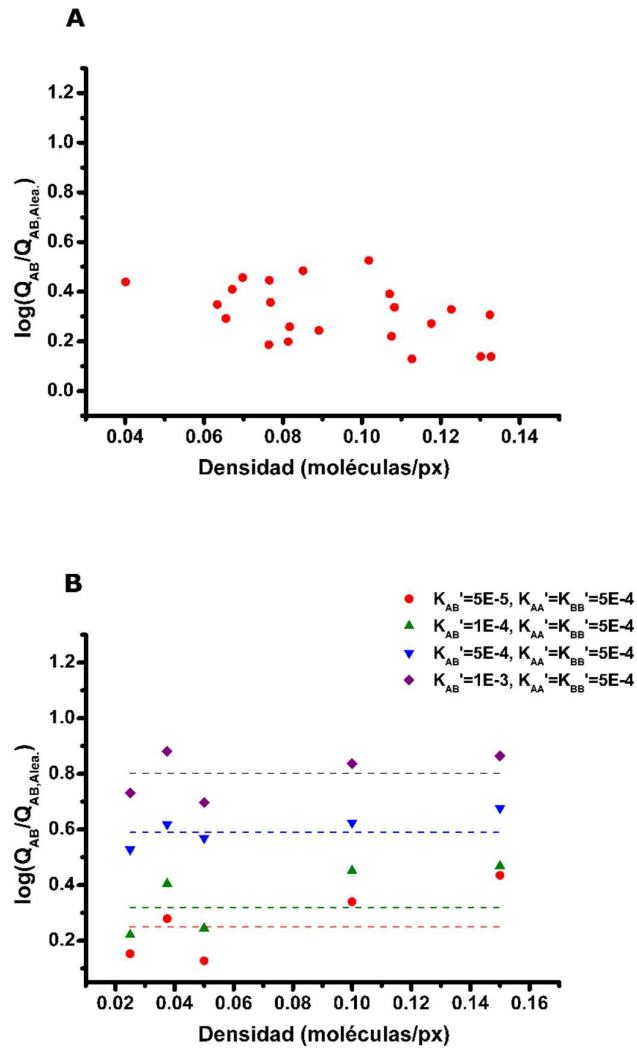


Figura 4.26. Variación de $\log(Q_{ij}/Q_{Bij,Alea})$ en función de la densidad para los casos experimentales (A) y para distintas simulaciones (B). Los valores de K_{AB}' , K_{AA}' y K_{BB}' (constante de equilibrio por unidad de volumen) utilizadas en las simulaciones se presentan en las leyendas de la figura. La línea punteada representa el valor promedio de $\log(Q_{ij}/Q_{Bij,Alea})$ para cada condición.

Finalmente, a partir de los $R_{Q_{AB}}/Q_{AB,Alea}$ promedio obtenidos para cada condición, se realizaron distintas curvas de calibración vinculando estos valores con los de $\log K_{AB}'$. En la Figura 4.27 se presentan tres de ellas. Para obtener la constante K_{AB}' correspondiente a las determinaciones experimentales, se utilizó el $R_{Q_{AB}}/Q_{AB,Alea}$ promedio asociado a las mismas, que fue igual a 0.31 ± 0.11 . La curva representada por el color negro en la Figura 4.27 ($K_{AA}'=K_{BB}'=1E-4$) daría lugar a $\log K_{AB}' = -3,81 \pm 0,20$, siendo este resultado inconsistente con la relación de cocientes hallados experimentalmente ($Q_{AB} < Q_{AA}, Q_{BB}$). Por tal motivo, no se utilizó esta curva de calibración. La curva roja ($K_{AA}'=K_{BB}'=5E-4$) y la azul ($K_{AA}'=K_{BB}'=1E-3$) dieron lugar a los siguientes resultados:

$$\log K_{AB}' = -4,10 \pm 0,20 ; \log K_{BB}' = \log K_{AA}' = -3,3$$

$$\log K_{AB}' = -4,31 \pm 0,20 ; \log K_{BB}' = \log K_{AA}' = -3$$

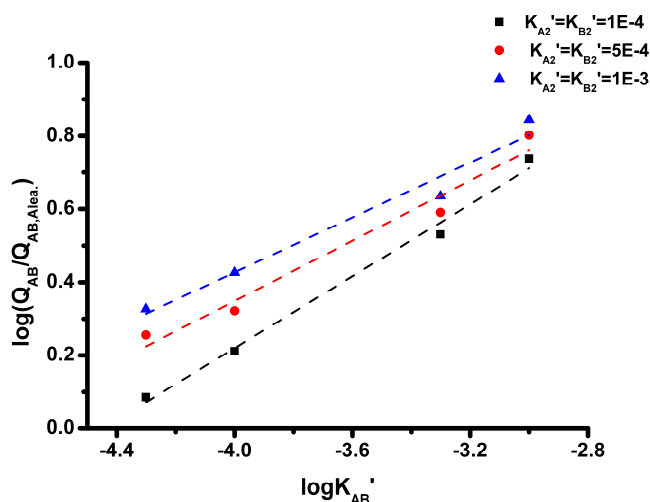


Figura 4.27. Curvas de calibración. Muestran la variación de $\log(Q_{AB}/Q_{AB,Alea})$ en función de $\log K_{AB}'$ para distintos valores de K_{AA}' y K_{BB}' (los mismos figuran en las legendas de la figura).

Ambos resultados fueron compatibles con la relación de cocientes hallada experimentalmente, por lo que se tomó como resultado final un valor promedio entre los dos casos ($\log K_{AB}' = -4,2 \pm 0,2$; $\log K_{AA}' = \log K_{BB}' = -3,2 \pm 0,2$). Por otro lado, teniendo en cuenta el volumen de estudio ($2,66 \times 2,66 \times 0,2 \mu m^3$), se transformó la constante por unidad de volumen en constante de equilibrio. Finalmente, se calculó la constante de equilibrio de disociación a través de una simple inversión de la constante de asociación. En la Tabla 4.3 se presentan los valores de constante halladas para la asociación cruzada (afinidad entre ABP-09 y AlexaFluor647) y las asociaciones entre moléculas del mismo tipo. También se pueden apreciar los valores expresados como la constante de disociación.

	K_{AB}	$K_{AA}=K_{BB}$
Constante de asociación (M^{-1})	$(5.0 \pm 1.5) \times 10^4$	$(5.7 \pm 2.4) \times 10^5$
Constante de disociación (M)	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^{-5}$	$(1.7 \pm 0.7) \times 10^{-6}$

Tabla 4.3. Valores de K_{AB} , K_{AA} y K_{BB} hallados en células HT22-CRHR1.

Como consideración final, cabe destacar que este método permitió obtener una constante de equilibrio que refleja la afinidad del antagonista por el receptor y podría utilizarse en forma general para cualquier caso donde se tengan dos tipos de moléculas fluorescentes que sean aptas para la adquisición de imágenes de STORM. Esta determinación se realizó en células hipocámpales de ratón, dando como resultado una constante válida para un entorno celular complejo, a diferencia de la mayoría de las constantes de afinidad informadas en literatura, que se obtienen aislando la proteína de interés y realizando experimentos en entornos distintos al celular. Si bien el valor de constante de disociación hallado ($20 \mu M$) es apreciablemente mayor al de otros antagonistas de CRHR1, las condiciones en las que se determinó la constante en el presente trabajo refleja en mejor medida el entorno fisiológico de interés para el estudio de CRHR1. Por otro lado, los ensayos de inhibición dieron como resultado una disminución de la actividad del receptor comparable a la que tiene lugar con el uso de antagonistas comerciales en las mismas concentraciones. Finalmente, es importante señalar que en los experimentos llevados a cabo se consideró que la inmunomarcación era específica, y por lo tanto una molécula de AlexaFluor647 equivalía a un receptor. Esta afirmación no es del todo correcta, ya que existe una proporción de marcado inespecífico de ambos colorantes que, si bien es baja, no es despreciable. La presencia de marcado inespecífico en células HT22-CRHR1 solamente puede dar lugar a una subestimación de la constante de afinidad, ya que se contabilizan como si fuesen moléculas libres, dando valores de N_A y N_B mayores a los reales y por lo tanto una K_{AB} menor. De este modo, la conclusión de que existe una afinidad química real entre el receptor y ABP-09 no pierde validez, y el valor de la constante de disociación de $20 \mu M$ representa una cota superior.

2.5.2.2. Análisis de afinidad a través de la distribución de primeros vecinos

Otra forma de analizar los datos para evaluar cuantitativamente la asociación en base a la proximidad es estudiando la distribución de primeros vecinos. Este estudio estadístico tiene sentido dado que, si se quiere detectar asociación molecular, es necesario observar la mayor proximidad, que se da cuando dos moléculas están vinculadas químicamente. En este enfoque se computa la distribución de distancias de cada molécula a su primer vecino. En un escenario donde interesan dos tipos de moléculas hay cuatro funciones de distribución diferentes: partiendo de moléculas de tipo A, se puede analizar la distribución de primeros vecinos A o B, y lo mismo ocurre

a partir de moléculas de tipo B. En adelante, se hará referencia a dichas funciones como f_{AA} , f_{AB} , f_{BA} y f_{BB} , donde la primera letra indica la molécula central y la segunda letra el tipo de molécula con la que se vincula. Es de hacer notar que f_{AB} y f_{BA} no son iguales. Al igual que en el análisis de Q_{ij} , se usará la distribución aleatoria como referencia.

En el Apéndice IV se puede hallar la deducción de las expresiones de la función de distribución de probabilidades acumulada complementaria de primeros vecinos (FDAC(r), $f_{ij}(r)$) en muestras distribuidas al azar en un espacio unidimensional, bidimensional o tridimensional. $f_{ij}(r)$ representa la fracción de moléculas que tienen su primer vecino a una distancia igual o mayor que r . Una distribución aleatoria en 1D presenta una relación lineal entre $\log(f_{ij})$ y r (distancia entre i y j), mientras que para un caso bidimensional la dependencia lineal es entre $\log(f_{ij})$ y r^2 . En la Figura 4.28 se muestra a modo de ejemplo la simulación de una distribución aleatoria de dos tipos de moléculas en una matriz fibrosa (1D, ya que los primeros vecinos se encuentran preferencialmente en una disposición longitudinal). En el panel A se presenta el espacio utilizado y en el B las localizaciones. Por otro lado, las figuras 4.28.C y 4.28.D representan las cuatro curvas logarítmicas de f_{AA} , f_{AB} , f_{BA} y f_{BB} obtenidas para dicha distribución en función de r y de r^2 . Se puede ver que las curvas en función de la distancia son lineales, mientras que la representadas en función del cuadrado de la misma se encuentran curvadas a distancias cortas. En el Apéndice IV se muestran los programas utilizados para las distintas simulaciones.

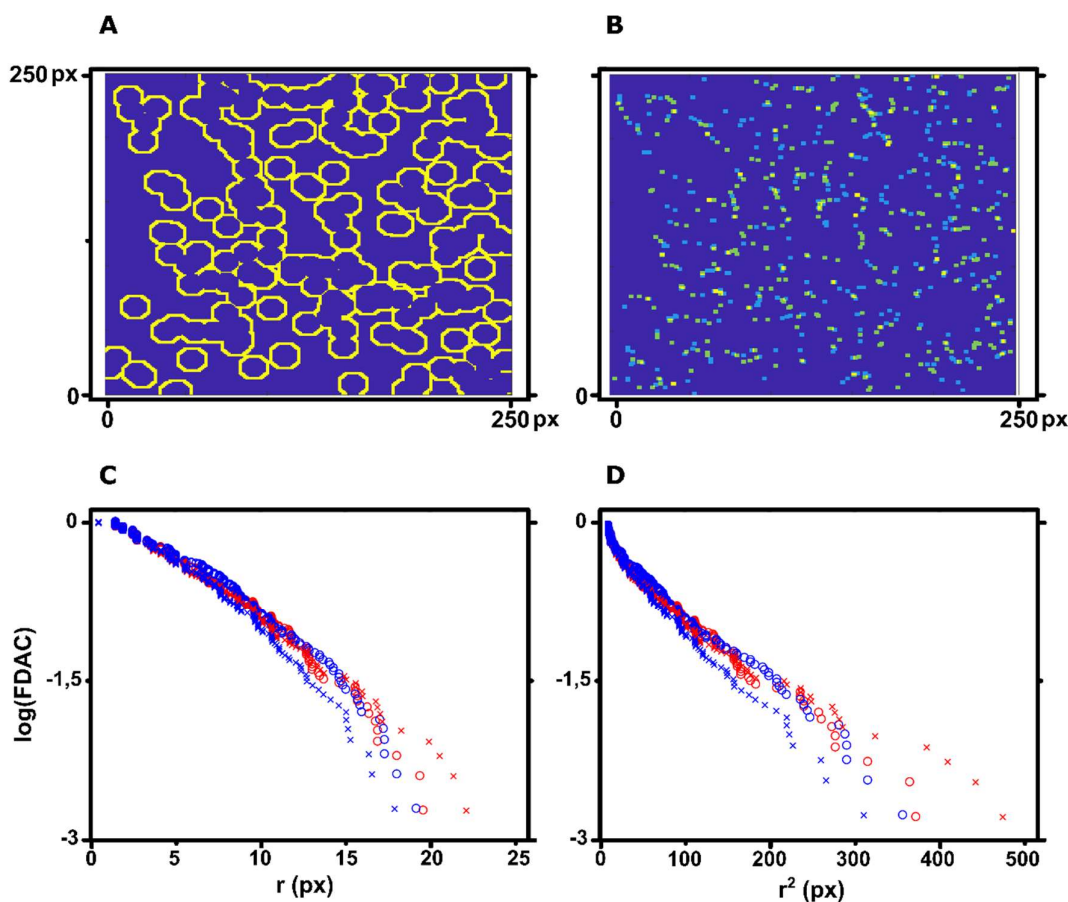


Figura 4.28. Simulación de una distribución aleatoria 1D para moléculas tipo A y B. (A) Espacio utilizado (región amarilla). (B) Localizaciones distribuidas al azar: 353 moléculas de A (celeste) y 339 de B (verde). El amarillo corresponde a píxeles colocalizados por azar. (C) Curvas logarítmicas de FDAC en función de la distancia. Cruces rojas: f_{AB} ; cruces azules: f_{BA} ; círculos rojos: f_{AA} ; círculos azules: f_{BB} . (D) Ídem (C), pero en función del cuadrado de la distancia. Las referencias de los símbolos son las mismas que en (C).

En la Figura 4.29 se presenta una serie de curvas logarítmicas de f_{AA} en función del cuadrado de la distancia para distribuciones aleatorias simuladas en 2D correspondientes a distintas densidades. Se puede ver que el valor absoluto de la pendiente está directamente relacionado con la concentración: densidades elevadas dan lugar a pendientes más negativas. Lo mismo ocurre para las curvas en función de la distancia en el caso unidimensional y en las curvas cruzadas (en ese caso, la pendiente refleja la densidad de la molécula vecina y no de la central).

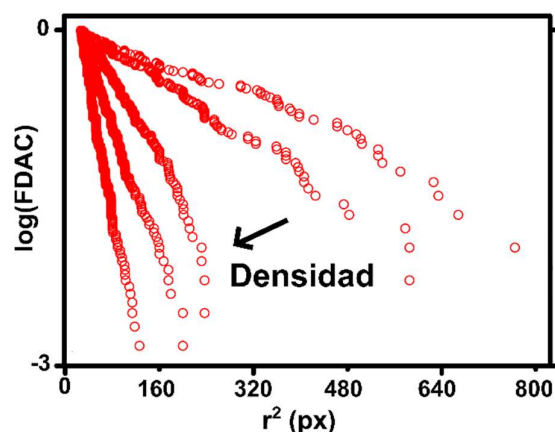


Figura 4.29. Variación de log(FDAC) para AA en una distribución aleatoria 2D. La densidad varía desde 100 moléculas hasta 1600, en una superficie de 250 x 250 píxeles.

La desviación de la linealidad en estas curvas en una muestra real es una primera evidencia de que la distribución no es aleatoria. El efecto de una asociación o afinidad entre moléculas se puede averiguar por comparación con distribuciones simuladas que presenten moléculas asociadas. Cualitativamente, es de esperar un incremento del módulo de la pendiente a distancias cortas, ya que habrá una proporción mayor de moléculas con un primer vecino en una posición muy próxima en comparación con en el caso aleatorio. En la Figura 4.30 se presentan las FDAC correspondientes a una región celular marcada con AlexaFluor647 (molécula A) y ABP-09 (molécula B), junto a las FDAC de una simulación realizada con el mismo número de moléculas de A y B, cuya distribución se basó en valores de $K'_{AB} = 10^{-4}$ y $K'_{AA} = K'_{BB} = 10^{-2}$. También se muestran en la misma figura las distribuciones de las localizaciones de la imagen real y la simulada.

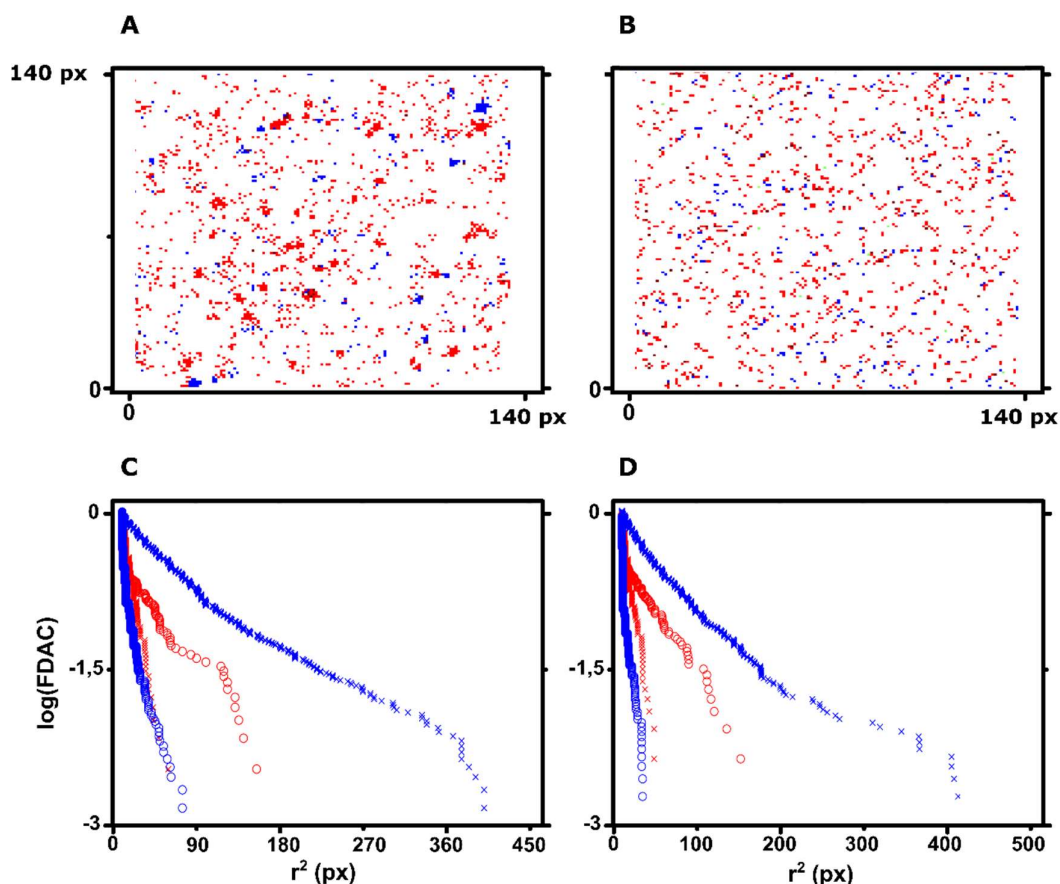


Figura 4.30. Comparación entre distribución experimental y simulada con $K'_{AB} = 10^{-4}$ y $K'_{AA} = K'_{BB} = 10^{-2}$. (A) Localizaciones experimentales; rojo: AlexaFluor647 (moléculas A) y azul: ABP-09 (moléculas B). (B) Localizaciones simuladas; rojo: moléculas A y azul: moléculas B. (C) Curvas logarítmicas de FDAC en función del cuadrado de la distancia para la distribución experimental. Cruces rojas: f_{AB} ; cruces azules: f_{BA} ; círculos rojos: f_{AA} ; círculos azules: f_{BB} . (D) Ídem (C), pero para la distribución simulada.

Una primera observación a realizar es la evidente presencia de asociaciones A-A, B-B y A-B en el caso real y en el simulado, ya que las cuatro curvas presentan una caída brusca de la FDAC a distancias cortas y un posterior régimen de menor pendiente. Este último comportamiento refleja en ambos casos la distribución aleatoria de las moléculas que no se encuentran asociadas y que tienen distancias de primeros vecinos mayores (notar que las pendientes a distancias largas de f_{AB} y f_{BB} , que se vinculan a la densidad de B libre, son muy similares entre sí, y lo mismo ocurre con f_{AA} y f_{BA}). Por otro lado, cabe destacar que las curvas f_{ij} simuladas y experimentales presentan una gran similitud. Esto se logró con un valor de K'_{AB} comparable al obtenido en la sección 2.5.2.1. y con valores de K'_{AA} y K'_{BB} un orden de magnitud mayor a los calculados en dicha sección. A diferencia de lo que ocurre con las curvas de FDAC, la distribución de localizaciones presenta diferencias importantes entre la muestra real y la simulada. Esto es lógico de esperar, dado que la distribución de primeros vecinos es sólo un aspecto de la distribución real, que contiene mucha más información.

Se puede ver que el análisis de la distribución de primeros vecinos es una herramienta de gran utilidad para el estudio de asociación entre distintas moléculas, ya que permite discernir con un simple tratamiento de datos si la distribución de localizaciones es aleatoria o si hay tendencia al agrupamiento. Por otro lado, una comparación con simulaciones puede permitir una estimación de las constantes que rigen dichas asociaciones. En este caso, su aplicación al estudio de la afinidad entre ABP-09 y AlexaFluor647 se complementó con el análisis descripto en la sección precedente y permitió ver que existe asociación entre moléculas del mismo tipo y asociación cruzada, verificando la unión de ABP-09 a CRHR1 con una afinidad similar a la hallada por el método de los cocientes Q_{ij} .

3. Conclusiones y perspectivas

En el presente capítulo se exploró la marcación del receptor CRHR1 a través de un antagonista fluorescente, con la finalidad de realizar estudios del mismo a través de microscopía de súper-resolución. Para ello, se realizaron estudios de *docking* sobre una familia de aza-BODIPYs propuestos como posibles antagonistas, utilizando una aproximación de receptor rígido-ligando flexible, junto a cálculos de energía bajo una aproximación de receptor y ligando flexibles. Se pudo verificar que las interacciones con el receptor fueron similares para algunos de los candidatos propuestos y ONO-2333 Ms, un antagonista comercial, y que a su vez en todos los casos las interacciones fueron levemente menores a las que presentó CP-376395 (el antagonista co-cristalizado con CRHR1).

A partir de estos estudios, se seleccionó un aza-BODIPY como antagonista a sintetizar (ABP-09). A pesar de las dificultades que presentó la síntesis, fue posible aislar el compuesto deseado, siendo el primer aza-BODIPY con sustituyentes metílicos en las posiciones 3,5 informado hasta el momento de la escritura de la tesis.

ABP-09 presentó una actividad como antagonista de CRHR1 comparable a la de CP-376395, verificada por ensayos biológicos. En particular, se comprobó una mengua en la generación de cAMP al estimular CRHR1 con CRH en presencia de ABP-09, así como también la disminución de la activación de ERK1/2 y Akt.

Por otro lado, ABP-09 presentó un rendimiento cuántico de fluorescencia elevado (0,86 en diclorometano), y propiedades de encendido y apagado adecuadas para ser utilizado en STORM. Se pudieron adquirir imágenes con una precisión de localización promedio de 23 nm, llegando en algunos casos a una precisión de 8 nm. Se realizaron experimentos de doble marcación con ABP-09 y anticuerpos funcionalizados con AlexaFluor647 para estudiar la afinidad

de ABP-09 y CRHR1. A través de un análisis cuantitativo de imágenes de STORM de dos colores, se pudo verificar la existencia de una afinidad química real entre ambos compuestos. Este resultado, congruente con la actividad inhibitoria determinada por ensayos biológicos, arrojó una constante de disociación del complejo ABP-09 / CRHR1 de 20 μM . Esta constante representa una cota superior, ya que puede haber uniones inespecíficas de ambos colorantes que en los experimentos realizados se contabilizaron como moléculas aisladas. La metodología utilizada representa una forma novedosa de estudiar afinidades, pudiendo evaluar la interacción ligando-receptor en su complejo entorno celular. Un estudio de distribución de primeros vecinos arrojó resultados compatibles con el análisis de afinidad a través del cálculo de la constante de equilibrio. Por otro lado, la utilización de una técnica de súper-resolución permitió estudiar cercanías entre moléculas del orden de los 18 nm, representando una mejora en un orden de magnitud respecto de la resolución alcanzada en microscopías de fluorescencia convencional.

En el presente trabajo el receptor elegido fue un GPCR de clase B de la secretina. Esta subfamilia representa una minoría dentro de los GPCR: cuenta con tan solo 15 receptores sobre un total de más de 800 GPCRs conocidos¹⁹¹. A su vez, recién en el año 2013 se cristalizaron los dos primeros GPCRs de clase B, siendo CRHR1 uno de ellos¹⁰⁷. La subfamilia más estudiada es la de los receptores clase A, siendo el receptor β 2-adrenérgico el sistema modelo para el estudio de los GPCR⁹⁴. Estos antecedentes dan una relevancia particular a este trabajo, ya que aporta una herramienta para profundizar el estudio en una subfamilia poco explorada hasta el momento. A su vez, teniendo en cuenta que las vías de señalización de CRH/CRHR1 dependen del contexto celular (tal como se señaló en el inciso 3.2.1. del Capítulo 1), se debe destacar el uso de neuronas hipocámpales (HT22) que brindan un entorno comparable al que se puede tener en animales o humanos. Una posible perspectiva para trabajos futuros es la utilización del antagonista fluorescente ABP-09 en cultivos primarios y en animales vivos, para estudiar de manera poco invasiva la distribución y localización de CRHR1. También se podrían realizar experimentos en células que permitan estudiar el mecanismo de inhibición de CRHR1 por ABP-09. Por ejemplo, se podrían marcar proteínas involucradas en la internalización de CRHR1, como las β -arrestinas y clatrina, y analizar su afinidad hacia ABP-09/CRHR1.

Finalmente, un aspecto relevante de este trabajo está relacionado a la generalización de este método para cualquier receptor cuya estructura cristalina se encuentre disponible. Si bien ABP-09 fue pensado para unirse a CRHR1 y probablemente no se pueda utilizar en otros sistemas, el hecho de diseñar un fluoróforo que sea afín por un sitio de unión es extrapolable a cualquier receptor. Considerando que las nanoscopías tienden a resoluciones en el orden del tamaño

molecular⁴⁸, el uso de pequeñas moléculas en lugar de anticuerpos o proteínas fluorescentes de gran tamaño es una perspectiva que irá en aumento en los próximos años. Por otro lado, el uso de este tipo de marcas permite estudiar receptores sin necesidad de fijar células ni de realizar transfecciones o clonados. A su vez, la posibilidad de utilizarse en experimentos con células vivas presenta una ventaja en comparación con el método tradicional de inmunomarcación¹⁹². Por último, la metodología presentada para el análisis de afinidad para imágenes de dos colores de STORM puede aplicarse a cualquier tipo de doble marca.

Capítulo 5: Conclusiones y perspectivas generales

En el presente trabajo de tesis se abordaron distintas temáticas vinculadas a la microscopía de fluorescencia en general y a la nanoscopía de STORM en particular. En el Capítulo 3 se estudió en profundidad el comportamiento de una familia de 3-hidroxicromonas con sustituyentes dadores y aceptores de electrones en posiciones clave y poco exploradas hasta el momento. Estos compuestos son ampliamente utilizados como sensores de entornos microheterogéneos en microscopía de fluorescencia debido a su emisión dual, y el estudio realizado en esta tesis aporta elementos importantes para comprender este fenómeno y brindar poder predictivo de cara al diseño de mejores sondas. En el Capítulo 4 se llevó a cabo un trabajo multidisciplinario, en el cual se combinaron estudios de *docking* para seleccionar un antagonista fluorescente de CRHR1, la síntesis del candidato seleccionado (ABP-09), ensayos biológicos y estudios de afinidad por imágenes de STORM.

A continuación, se presentan las principales conclusiones y perspectivas que se desprenden del presente trabajo.

1. Se pudo evaluar el efecto de sustituyentes dadores y aceptores de electrones en las posiciones 2 y 7 de la estructura base de 3-HC. Se comprobó que la presencia de un dador y un aceptor en cada posición da lugar a un comportamiento *push-pull* que incrementa el carácter de transferencia de carga del estado excitado, dando lugar a una mayor sensibilidad solvato- y termocrómica. A su vez, se verificó que este efecto es más pronunciado si el aceptor se encuentra en la posición 7 (anillo B) y el dador en posición 2 (anillo A). Este fenómeno se estudió por espectroscopía de emisión estacionaria y resuelta en el tiempo a distintas temperaturas, así como también por métodos computacionales.
2. A través de los estudios de emisión resuelta en el tiempo a temperatura variable fue posible conocer el escenario cinético completo del proceso ESIPT de una de las 3-HC estudiadas, el compuesto **2**. Esto incluyó el cálculo de la energía de activación y del factor pre-exponencial de Arrhenius de las reacciones directa e inversa del proceso ESIPT, y las constantes de decaimiento de las formas N^* y T^* hacia el estado electrónico fundamental, S_0 . Por otro lado, se comprobó que el proceso ESIPT es endotérmico y se calculó la diferencia energética entre N^* y T^* .
3. El estudio cinético de **2** reveló que a temperaturas bajas los tiempos característicos de la transferencia de protón son comparables a los tiempos de decaimiento de N^* y T^* , por lo que

ambos procesos se encuentran acoplados. A temperaturas elevadas, el establecimiento del equilibrio tautomérico es mucho más rápido (del orden de 300 ps en diclorometano) y la desactivación ocurre desde una situación de equilibrio entre N^* y T^* . De este modo, se verificó un control termodinámico a temperaturas moderadas/elevadas (25 a 50°C) y un escenario intermedio entre control termodinámico y control cinético a temperaturas bajas (< 25°C).

4. Una perspectiva interesante para las sondas analizadas en esta tesis es su utilización en la visualización de proceso de interés biológico que produzcan cambios de entorno locales. En ese sentido, la gran susceptibilidad hallada para los compuestos **2** y **3** resulta promisoria.
5. En el Capítulo 4 se llevó adelante una estrategia que resultó exitosa para hallar un marcador fluorescente del receptor GPCR de clase B CRHR1. En particular, se diseñó una familia de compuestos aza-BODIPYs como posibles antagonistas del receptor y se escogió uno de ellos (ABP-09) en función de los resultados de *docking* y criterios de estabilidad fotoquímica. Posteriormente, se logró sintetizar el compuesto ABP-09, siendo el primer aza-BODIPY asimétrico con sustituyentes metílicos en las posiciones 3 y 5. Finalmente, se logró verificar la afinidad de ABP-09 por CRHR1 a través de imágenes de STORM y de ensayos biológicos que demuestran su actividad como antagonista. Se comprobó una actividad como antagonista similar a la del antagonista comercial CP-376395 (ligando co-cristalizado con CRHR1 en 2013).
6. ABP-09 presentó propiedades óptimas para nanoscopía de STORM. Su elevado rendimiento cuántico de fluorescencia (0,86 en metanol) y su capacidad de habitar estados oscuros permitió adquirir imágenes de STORM con una precisión de 23 nm, comparable a la obtenida para uno de los fluoróforos más utilizados en esta técnica, AlexaFluor647, en condiciones de adquisición similares.
7. Se desarrollaron dos métodos de análisis de imágenes de STORM para determinar la afinidad entre ABP-09 y CRHR1. Uno de ellos permitió hallar una constante de afinidad en un contexto celular a través del conteo de pares y de moléculas libres. Por su parte, el otro método se basó en el uso de las funciones de distribución acumulada complementaria (FDAC) de primeros vecinos y permitió comparar en forma exitosa las funciones experimentales con las generadas a partir de distribuciones simuladas. Ambos métodos son extrapolables a otros sistemas, pudiendo utilizarse para analizar la afinidad entre moléculas en imágenes de cualquier nanoscopía basada en localización de moléculas individuales.

- 8.** Si bien ABP-09 fue diseñado para interactuar con CRHR1, la estrategia utilizada es extrapolable a cualquier receptor cuya estructura cristalográfica se encuentre disponible. Encontrar marcadores del menor tamaño posible es de gran utilidad, ya que las nanoscopías evolucionan hacia resoluciones del tamaño molecular. Por otro lado, la utilización de antagonistas fluorescentes permite visualizar receptores en células vivas y no requiere realizar transfecciones. Se debe señalar que el sistema de estudio se ve afectado por la presencia del antagonista, ya que el mismo disminuye la actividad del receptor.
- 9.** Los experimentos realizados en este trabajo son de particular relevancia dado que se llevaron a cabo en células hipocampales, reflejando un contexto celular similar al que posee CRH/CRHR1 en organismos vivos, y por presentar la marcación de una clase de GPCRs poco explorada (clase B). Una perspectiva interesante es la aplicación de ABP-09 para estudiar la localización de CRHR1 en cultivos primarios o animales vivos. Esta posibilidad toma particular relevancia si se tiene en cuenta la ausencia de anticuerpos fiables para la marca de CRHR1 y, por otro lado, la necesidad de utilizar moléculas pequeñas cuando se trabaja con animales vivos y se desea atravesar la barrera hematoencefálica.

Bibliografía

1. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer, Boston, MA, 2006).
2. Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. für Mikroskopische Anat.* **9**, 413–468 (1873).
3. Axelrod, D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* **2**, 764–774 (2001).
4. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73–76 (1990).
5. Hell, S. & Stelzer, E. H. K. Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A* **9**, 2159–2166 (1992).
6. Gustafsson, M. G. L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* **198**, 82–87 (2000).
7. Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1387–1395 (2003).
8. Gell, C., Brockwell, D. & Smith, D. *Handbook of single molecule fluorescence spectroscopy*. (Oxford University Press, 2006).
9. Orrit, M. & Bernard, J. Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal. *Phys. Rev. Lett.* **65**, 2716–2719 (1990).
10. Betzig, E. & Chichester, R. J. Single Molecules Observed by Near-Field Scanning Optical Microscopy. *Science* **262**, 1422–1425 (1993).
11. Macklin, J. J., Trautman, J. K., Harris, T. D. & Brus, L. E. Imaging and Time-Resolved Spectroscopy of Single Molecules at an Interface. **272**, 255–258 (1996).
12. Mashanov, G. I., Tacon, D., Knight, a E., Peckham, M. & Molloy, J. E. Visualizing single molecules inside living cells using total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods* **29**, 142–152 (2003).
13. Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K. & Yanagida, T. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* **374**, 555–559 (1995).
14. Dickson, R. M., Norris, D. J., Tzeng, Y.-L. & Moerner, W. E. Three-Dimensional Imaging of Single Molecules Solvated in Pores of Poly(acrylamide) Gels. *Science* **274**, 966–969 (1996).
15. Ghosh, R. N. & Webb, W. W. Automated detection and tracking of individual and clustered cell surface low density lipoprotein receptor molecules. *Biophys. J.* **66**, 1301–1318 (1994).
16. Joo, C., Balci, H., Ishitsuka, Y., Buranachai, C. & Ha, T. Advances in Single-Molecule Fluorescence Methods for Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 51–76 (2008).
17. Zondervan, R., Kulzer, F., Orlinskii, S. B. & Orrit, M. Photoblinking of Rhodamine 6G IN Poly (vinyl alcohol): Radical Dark State Formed through the Triplet. *J. Phys. Chem. A* **107**,

- 6770–6776 (2003).
18. Thompson, R. E., Larson, D. R. & Webb, W. W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* **82**, 2775–2783 (2002).
 19. Yildiz, A. *et al.* Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* **300**, 2061–2065 (2003).
 20. Gordon, M. P., Ha, T. & Selvin, P. R. Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6462–6465 (2004).
 21. Ulbrich, M. H. & Isacoff, E. Y. Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods* **4**, 319–321 (2007).
 22. Brejc, K. *et al.* Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 2306–2311 (1997).
 23. Dickson, R. M., Cubitt, a B., Tsien, R. Y. & Moerner, W. E. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355–358 (1997).
 24. Bates, M., Blosser, T. R. & Zhuang, X. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 108101 (2005).
 25. Forster, T. 10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation. *Discuss. Faraday Soc.* **27**, 7–17 (1959).
 26. Stryer, L. Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 819–846 (1978).
 27. Ha, T. *et al.* Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 6264–6268 (1996).
 28. McKinney, S. A., Déclais, A.-C., Lilley, D. M. J. & Ha, T. Structural dynamics of individual Holliday junctions. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 93–97 (2003).
 29. Joo, C. *et al.* Real-Time Observation of RecA Filament Dynamics with Single Monomer Resolution. *Cell* **126**, 515–527 (2006).
 30. Schönfelder, J., Perez-Jimenez, R. & Muñoz, V. A simple two-state protein unfolds mechanically via multiple heterogeneous pathways at single-molecule resolution. *Nat. Commun.* **7**, 1–8 (2016).
 31. Schmidt, T., Schütz, G. J., Baumgartner, W., Gruber, H. J. & Schindler, H. Imaging of single molecule diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 2926–2929 (1996).
 32. Levi, V., Ruan, Q. Q. & Gratton, E. 3-D particle tracking in a two-photon microscope: Application to the study of molecular dynamics in cells. *Biophys. J.* **88**, 2919–2928 (2005).
 33. Liu, S. L. *et al.* Visualizing the endocytic and exocytic processes of wheat germ agglutinin by quantum dot-based single-particle tracking. *Biomaterials* **32**, 7616–7624 (2011).
 34. Kusumi, A. *et al.* Paradigm Shift of the Plasma Membrane Concept from the Two-Dimensional Continuum Fluid to the Partitioned Fluid: High-Speed Single-Molecule Tracking of Membrane Molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 351–378 (2005).

35. Hern, J. a *et al.* Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2693–2698 (2010).
36. Weigel, A. V., Simon, B., Tamkun, M. M. & Krapf, D. Ergodic and nonergodic processes coexist in the plasma membrane as observed by single-molecule tracking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 6438–6443 (2011).
37. Sako, Y., Minoghchi, S. & Yanagida, T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 168–72 (2000).
38. Thompson, N. L. Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Top. Fluoresc. Spectrosc.* **1**, 337–378 (1991).
39. Widengren, J., Rigler, R. & Mets, Ü. Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Fluoresc.* **4**, 255–258 (1994).
40. Chen, Y., Müller, J. D., Tetin, S. Y., Tyner, J. D. & Gratton, E. Probing ligand protein binding equilibria with fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.* **79**, 1074–1084 (2000).
41. Hell, S. W. & Wichmann, J. Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 780–782 (1994).
42. Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A. & Hell, S. W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 8206–8210 (2000).
43. Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3**, 793–795 (2006).
44. Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S. & Hell, S. W. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 17565–17569 (2005).
45. Betzig, E. *et al.* Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* **313**, 1642 LP-1645 (2006).
46. Sharonov, A. & Hochstrasser, R. M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 18911–18916 (2006).
47. Fölling, J. *et al.* Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat. Methods* **5**, 943–945 (2008).
48. Balzarotti, F. *et al.* Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. *Science* **355**, 606–612 (2017).
49. Hell, S. W. Microscopy and its focal switch. *Nat. Methods* **6**, 24–32 (2009).
50. Dempsey, G. T., Vaughan, J. C., Chen, K. H., Bates, M. & Zhuang, X. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods* **8**, 1027–1040 (2011).
51. Aramendía, P. F. & Bossi, M. L. Probes for Nanoscopy: Photoswitchable Fluorophores. in *Far-Field Optical Nanoscopy* (eds. Tinnefeld, P., Eggeling, C. & Hell, S. W.) 189–213 (Springer Berlin Heidelberg, 2012).

52. Fernández-Suárez, M. & Ting, A. Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 929–943 (2008).
53. van de Linde, S., Heilemann, M. & Sauer, M. Live-Cell Super-Resolution Imaging with Synthetic Fluorophores. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **63**, 519–540 (2012).
54. Ha, T. & Tinnefeld, P. Photophysics of Fluorescent Probes for Single-Molecule Biophysics and Super-Resolution Imaging. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **63**, 595–617 (2012).
55. Barabas, F. M. Nanoscopía de fluorescencia por localización estocástica de moléculas individuales. (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 2017).
56. Heilemann, M. *et al.* Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 6172–6176 (2008).
57. Heilemann, M., Margeat, E., Kasper, R., Sauer, M. & Tinnefeld, P. Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 3801–3806 (2005).
58. Dempsey, G. T. *et al.* Photoswitching mechanism of cyanine dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18192–18193 (2009).
59. Olivier, N., Keller, D., Rajan, V. S., Gönczy, P. & Manley, S. Simple buffers for 3D STORM microscopy. *Biomed. Opt. Express* **4**, 885–899 (2013).
60. Manley, S. *et al.* High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat. Methods* **5**, 155–157 (2008).
61. Henriques, R., Griffiths, C., Rego, E. H. & Mhlanga, M. M. PALM and STORM: Unlocking live-cell super-resolution. *Biopolymers* **95**, 322–331 (2011).
62. Huang, B., Wang, W., Bates, M. & Zhuang, X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* **319**, 810–813 (2008).
63. Hein, B. *et al.* Stimulated emission depletion nanoscopy of living cells using SNAP-tag fusion proteins. *Biophys. J.* **98**, 158–163 (2010).
64. Westphal, V. *et al.* Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science* **320**, 246–249 (2008).
65. Pellett, P. A. *et al.* Two-color STED microscopy in living cells. *Biomed. Opt. Express* **2**, 2364–2371 (2011).
66. Kopek, B. G., Shtengel, G., Xu, C. S., Clayton, D. A. & Hess, H. F. Correlative 3D superresolution fluorescence and electron microscopy reveal the relationship of mitochondrial nucleoids to membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 6136–6141 (2012).
67. Coltharp, C. & Xiao, J. Superresolution microscopy for microbiology. *Cell. Microbiol.* **14**, 1808–1818 (2012).
68. Sigrist, S. J. & Sabatini, B. L. Optical super-resolution microscopy in neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 86–93 (2012).
69. Han, R., Li, Z., Fan, Y. & Jiang, Y. Recent Advances in Super-Resolution Fluorescence Imaging and Its Applications in Biology. *J. Genet. Genomics* **40**, 583–595 (2013).

70. Demchenko, A. P., Tang, K.-C. & Chou, P.-T. Excited-state proton coupled charge transfer modulated by molecular structure and media polarization. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 1379–1408 (2013).
71. Holsboer, F. & Ising, M. Stress Hormone Regulation: Biological Role and Translation into Therapy. *Annu. Rev. Psychol.* **61**, 81–109 (2009).
72. de Kloet, E. R., Joëls, M. & Holsboer, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 463–475 (2005).
73. Sengupta, P. K. & Kasha, M. Excited state proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxyflavone and quercetin. *Chem. Phys. Lett.* **68**, 382–385 (1979).
74. Yushchenko, D. a, Fauerbach, J. a, Thirunavukkuarasu, S., Jares-Erijman, E. a & Jovin, T. M. Fluorescent ratiometric MFC probe sensitive to early stages of alpha-synuclein aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 7860–7861 (2010).
75. Shvadchak, V. V., Falomir-Lockhart, L. J., Yushchenko, D. A. & Jovin, T. M. Specificity and kinetics of alpha-synuclein binding to model membranes determined with fluorescent excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) probe. *J. Biol. Chem.* **286**, 13023–13032 (2011).
76. Liu, B., Wang, J., Zhang, G., Bai, R. & Pang, Y. Flavone-based ESIPT ratiometric chemodosimeter for detection of cysteine in living cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 4402–4407 (2014).
77. Kwon, J. E. & Park, S. Y. Advanced organic optoelectronic materials: Harnessing excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) process. *Adv. Mater.* **23**, 3615–3642 (2011).
78. Klymchenko, A. S. & Demchenko, A. P. Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5**, 461–468 (2003).
79. Kenfack, C. A., Klymchenko, A. S., Duportail, G., Burger, A. & Mély, Y. Ab initio study of the solvent H-bonding effect on ESIPT reaction and electronic transitions of 3-hydroxychromone derivatives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 8910–8918 (2012).
80. Klymchenko, A. S., Pivovarenko, V. G., Ozturk, T. & Demchenko, A. P. Modulation of the solvent-dependent dual emission in 3-hydroxychromones by substituents. *New J. Chem.* **27**, 1336–1343 (2003).
81. Strandjord, A. J. G. & Barbara, P. F. Proton-transfer kinetics of 3-hydroxyflavone: Solvent effects. *J. Phys. Chem.* **89**, 2355–2361 (1985).
82. Schwartz, B. J., Peteanu, L. A. & Harris, C. B. Direct observation of fast proton transfer: Femtosecond photophysics of 3-hydroxyflavone. *J. Phys. Chem.* **96**, 3591–3598 (1992).
83. Chou, P., Pu, S., Cheng, Y., Yu, W. & Yu, Y. Femtosecond Dynamics on Excited-State Proton/ Charge-Transfer Reaction in 4'-N, N -Diethylamino-3-hydroxyflavone. The Role of Dipolar Vectors in Constructing a Rational Mechanism. *J. Phys. Chem. A* **109**, 3777–3787 (2005).
84. M'Baye, G. *et al.* Fluorescent dyes undergoing intramolecular proton transfer with improved sensitivity to surface charge in lipid bilayers. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 71–76 (2007).

85. Giordano, L., Shvadchak, V. V., Fauerbach, J. A., Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. Highly solvatochromic 7-aryl-3-hydroxychromones. *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 1011–1016 (2012).
86. Spiess, J., Rivier, J., Rivier, C. & Vale, W. Primary Structure of Corticotropin-Releasing Factor from Ovine Hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 6517–6521 (1981).
87. Eaves, M., Thatcher-Britton, K., Rivier, J., Vale, W. & Koob, G. F. Effects of corticotropin releasing factor on locomotor activity in hypophysectomized rats. *Peptides* **6**, 923–926 (1985).
88. Dautzenberg, F. M. & Hauger, R. L. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 71–77 (2002).
89. Inda, C. Caracterización de distintas fuentes de cAMP en la señalización del GPCR CRHR1. (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 2017).
90. Hemley, C. F., McCluskey, A. & Keller, P. A. Corticotropin releasing hormone - a GPCR drug target. *Curr. Drug Targets* **8**, 105–115 (2007).
91. Pioszak, A. A., Parker, N. R., Suino-Powell, K. & Xu, H. E. Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *J. Biol. Chem.* **283**, 32900–32912 (2008).
92. Drews, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science* **287**, 1960–1964 (2000).
93. Hopkins, A. L. & Groom, C. R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 727–730 (2002).
94. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. & Kobilka, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–363 (2009).
95. Rasmussen, S. G. F. *et al.* Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor–Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555 (2011).
96. Moore, C. A. C., Milano, S. K. & Benovic, J. L. Regulation of Receptor Trafficking by GRKs and Arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 451–482 (2007).
97. Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A. K. & Lefkowitz, R. J. Molecular Mechanism of β -Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **52**, 179–197 (2012).
98. Inda, C. *et al.* Different cAMP sources are critically involved in G protein-coupled receptor CRHR1 signaling. *J. Cell Biol.* **214**, 181–195 (2016).
99. Wootten, D., Miller, L. J., Koole, C., Christopoulos, A. & Sexton, P. M. Allostery and Biased Agonism at Class B G Protein-Coupled Receptors. *Chem. Rev.* **117**, 111–138 (2017).
100. Li, Y., Maher, P. & Schubert, D. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates glutamate-induced nerve cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 7748–7753 (1998).
101. Liu, J., Li, L. & Suo, W. Z. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci.* **84**, 267–271 (2009).
102. Klarenbeek, J., Goedhart, J., Van Batenburg, A., Groenewald, D. & Jalink, K. Fourth-generation Epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: Characterization of dedicated sensors for FLIM, for

- radiometry and with high affinity. *PLoS One* **10**, 1–11 (2015).
103. Bonfiglio, J. J. *et al.* B-Raf and CRHR1 Internalization Mediate Biphasic ERK1/2 Activation by CRH in Hippocampal HT22 Cells. *Mol. Endocrinol.* **27**, 491–510 (2013).
104. Bonfiglio, J. J. *et al.* The Corticotropin-Releasing Hormone Network and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Molecular and Cellular Mechanisms Involved. *Neuroendocrinology* **94**, 12–20 (2011).
105. Fleck, B. A., Hoare, S. R. J., Pick, R. R., Bradbury, M. J. & Grigoriadis, D. E. Binding kinetics redefine the antagonist pharmacology of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**, 518–31 (2012).
106. Grammatopoulos, D. K. & Chrousos, G. P. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 436–444 (2002).
107. Hollenstein, K. *et al.* Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* **499**, 438–43 (2013).
108. Refojo, D. *et al.* Glutamatergic and Dopaminergic Neurons Mediate Anxiogenic and Anxiolytic Effects of CRHR1. *Science* **333**, 1903–1907 (2011).
109. Ge, Y. & O'Shea, D. F. Azadipyrromethenes: from traditional dye chemistry to leading edge applications. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 3846–3864 (2016).
110. Loudet, A. & Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **107**, 4891–4932 (2007).
111. Ulrich, G., Ziessel, R. & Harriman, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: Versatility unsurpassed. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 1184–1201 (2008).
112. Burghart, A. *et al.* 3,5-Diaryl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) Dyes: Synthesis, Spectroscopic, Electrochemical, and Structural Properties. *J. Org. Chem.* **64**, 7813–7819 (1999).
113. Chen, J., Burghart, A., Derecskei-Kovacs, A. & Burgess, K. 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) Dyes Modified for Extended Conjugation and Restricted Bond Rotations. *J. Org. Chem.* **65**, 2900–2906 (2000).
114. Leen, V. *et al.* 1,7-disubstituted boron dipyrromethene (BODIPY) dyes: Synthesis and spectroscopic properties. *J. Org. Chem.* **76**, 8168–8176 (2011).
115. Karlsson, J. K. G. & Harriman, A. Origin of the Red-Shifted Optical Spectra Recorded for Aza-BODIPY Dyes. *J. Phys. Chem. A* **120**, 2537–2546 (2016).
116. Zhao, W. & Carreira, E. M. Conformationally restricted aza-BODIPY: Highly fluorescent, stable near-infrared absorbing dyes. *Chem. Eur. J.* **12**, 7254–7263 (2006).
117. Liras, M. *et al.* Synthesis, Photophysical Properties, and Laser Behavior of 3-Amino and 3-Acetamido BODIPY Dyes. *Org. Lett.* **9**, 4183–4186 (2007).
118. Jiang, X.-D. *et al.* A styryl-containing aza-BODIPY as a near-infrared dye. *RSC Adv.* **4**, 60970–60973 (2014).
119. Deniz, E. *et al.* Photoswitchable fluorescent dyads incorporating bodipy and [1,3]oxazine

- components. *J. Phys. Chem. A* **114**, 11567–11575 (2010).
120. King, J. T., Yu, C., Wilson, W. L. & Granick, S. Super-resolution study of polymer mobility fluctuations near cD. *ACS Nano* **8**, 8802–8809 (2014).
 121. Zhang, Y. *et al.* Photoactivatable BODIPYs Designed to Monitor the Dynamics of Supramolecular Nanocarriers. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 4709–4719 (2015).
 122. Ali, F. *et al.* A Super-Resolution Probe to Monitor HNO Levels in the Endoplasmic Reticulum of Cells. *Anal. Chem.* **89**, 12087–12093 (2017).
 123. Hall, M. J., McDonnell, S. O., Killoran, J. & O'Shea, D. F. A modular synthesis of unsymmetrical tetraarylazadipyrromethenes. *J. Org. Chem* **70**, 5571–5578 (2005).
 124. Palma, A. *et al.* New on-bead near-infrared fluorophores and fluorescent sensor constructs. *Org. Lett.* **11**, 3638–41 (2009).
 125. Grossi, M. *et al.* Mechanistic insight into the formation of tetraarylazadipyrromethenes. *J. Org. Chem.* **77**, 9304–9312 (2012).
 126. Wu, D. & Shea, D. F. O. Synthesis and Properties of Near-Infrared Fluorophores. *Org. Lett.* **15**, 3392–3395 (2013).
 127. Vinegoni, C. *et al.* Measurement of drug-target engagement in live cells by two-photon fluorescence anisotropy imaging. *Nat. Protoc.* **12**, 1472–1497 (2017).
 128. Wahl, M. Time-correlated single photon counting. *Tech. Note (PicoQuant GmbH)* 1–14 (2014).
 129. Barabas, F. M., Masullo, L. A. & Stefani, F. D. Note: Tormenta: An open source Python-powered control software for camera based optical microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **87**, 126103 (2016).
 130. Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Švindrych, Z. & Hagen, G. M. ThunderSTORM: A comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics* **30**, 2389–2390 (2014).
 131. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
 132. Baddeley, D., Cannell, M. B. & Soeller, C. Visualization of Localization Microscopy Data. *Microsc. Microanal.* **16**, 64–72 (2010).
 133. Szalai, A. *et al.* Temperature dependent spectroscopic and excited state dynamics of 3-hydroxychromones with electron donor and acceptor substituents Supplementary information for review only. *Methods Appl. Fluoresc.* **5**, 24011 (2017).
 134. Wang, Z. *et al.* An efficient method for the selective iodination of alpha,beta-unsaturated ketones. *Synthesis (Stuttg.)* **2008**, 3675–3681 (2008).
 135. Gorman, A. *et al.* In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10619–10631 (2004).
 136. Hall, M. J., McDonnell, S. O., Killoran, J. & O'Shea, D. F. A modular synthesis of unsymmetrical tetraarylazadipyrromethenes. *J. Org. Chem.* **70**, 5571–5578 (2005).

137. Bonfiglio, J. J. Mecanismos moleculares de la señalización celular mediada por la hormona CRH a través de su receptor CRHR1. (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 2008).
138. Klarenbeek, J. B., Goedhart, J., Hink, M. A., Gadella, T. W. J. & Jalink, K. A mTurquoise-Based cAMP Sensor for Both FLIM and Ratiometric Read-Out Has Improved Dynamic Range. *PLoS One* **6**, e19170 (2011).
139. Frisch, M. J. *et al.* Gaussian 09, Revision B01. (Wallingford CT Gaussian, Inc.) (2009).
140. Yanai, T., Tew, D. P. & Handy, N. C. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* **393**, 51–57 (2004).
141. Adamo, C. & Jacquemin, D. The calculations of excited-state properties with Time-Dependent Density Functional Theory. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 845–856 (2013).
142. Tomasi, J. & Persico, M. Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent. *Chem. Rev.* **94**, 2027–2094 (1994).
143. Barone, V., Cossi, M. & Tomasi, J. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. *J. Chem. Phys.* **107**, 3210–3221 (1997).
144. Impropa, R., Barone, V., Scalmani, G. & Frisch, M. J. A state-specific polarizable continuum model time dependent density functional theory method for excited state calculations in solution. *J. Chem. Phys.* **125**, 54103 (2006).
145. Version 3.7.2, ed.; MolSoft, LLC: La Jolla, CA, 2012.
146. Abagyan, R., Totrov, M. & Kuznetsov, D. ICM—A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *J. Comput. Chem.* **15**, 488–506 (1994).
147. Nemethy, G. *et al.* Energy parameters in polypeptides. 10. Improved geometrical parameters and nonbonded interactions for use in the ECEPP/3 algorithm, with application to proline-containing peptides. *J. Phys. Chem.* **96**, 6472–6484 (1992).
148. Brand, C. S., Hocker, H. J., Gorfe, A. A., Cavasotto, C. N. & Dessauer, C. W. Isoform Selectivity of Adenylyl Cyclase Inhibitors: Characterization of Known and Novel Compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **347**, 265–275 (2013).
149. Leal, E. S. *et al.* Discovery of novel dengue virus entry inhibitors via a structure-based approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 3851–3855 (2017).
150. Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. *J. Comput. Chem.* **17**, 490–519 (1996).
151. Halgren, T. A. The representation of van der Waals (vdW) interactions in molecular mechanics force fields: potential form, combination rules, and vdW parameters. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7827–7843 (1992).
152. Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field II. MMFF94 van der Waals and Electrostatic Parameters for Intermolecular Interactions. *J. Comput. Chem.* **17**, 520–552 (2000).
153. Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. III. Molecular Geometries and Vibrational Frequencies for MMFF94. *J. Comput. Chem.* **17**, 553–586 (2000).

154. Halgren, T. A. Merck Molecular Force Field. V. Extension of MMFF94 Using Experimental Data, Additional Computational Data, and Empirical Rules. *J. Comput. Chem.* **17**, 616–641 (2000).
155. Totrov, M. & Abagyan, R. Protein-Ligand Docking as an Energy Optimization Problem. in *Drug-Receptor Thermodynamics: Introduction and Applications* (ed. Robert B. Raffa) 603 (2001).
156. Cavasotto, C. N. & Abagyan, R. A. Protein Flexibility in Ligand Docking and Virtual Screening to Protein Kinases. *J. Mol. Biol.* **337**, 209–225 (2004).
157. Cavasotto, C. N. *et al.* Discovery of Novel Chemotypes to a G-Protein-Coupled Receptor through Ligand-Steered Homology Modeling and Structure-Based Virtual Screening. *J. Med. Chem.* **51**, 581–588 (2008).
158. Phatak, S. S., Gatica, E. A. & Cavasotto, C. N. Ligand-Steered Modeling and Docking: A Benchmarking Study in Class A G-Protein-Coupled Receptors. *J. Chem. Inf. Model.* **50**, 2119–2128 (2010).
159. Tomin, V. I., Demchenko, A. P. & Chou, P.-T. Thermodynamic vs. kinetic control of excited-state proton transfer reactions. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **22**, 1–18 (2015).
160. Tomin, V. I., Oncul, S., Smolarczyk, G. & Demchenko, A. P. Dynamic quenching as a simple test for the mechanism of excited-state reaction. *Chem. Phys.* **342**, 126–134 (2007).
161. Dereka, B., Letrun, R., Svehkarev, D., Rosspeintner, A. & Vauthey, E. Excited-state dynamics of 3-hydroxyflavone anion in alcohols. *J. Phys. Chem. B* **119**, 2434–2443 (2015).
162. Ameer-Beg, S. *et al.* Ultrafast Measurements of Excited State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT) in Room Temperature Solutions of 3-Hydroxyflavone and Derivatives. *J. Phys. Chem. A* **105**, 3709–3718 (2001).
163. Swinney, T. C., Kelley, D. F. & Kelleys, D. F. Proton transfer dynamics in substituted 3-hydroxyflavones: Solvent polarization effects. *J. Chem. Phys.* **99**, 211–221 (1993).
164. Roshal, A. D., Organero, J. A. & Douhal, A. Tuning the mechanism of proton-transfer in a hydroxyflavone derivative. *Chem. Phys. Lett.* **379**, 53–59 (2003).
165. Shynkar, V. V. *et al.* Picosecond Time-Resolved Fluorescence Studies Are Consistent with Reversible Excited-State Intramolecular Proton Transfer in 4'-(Dialkylamino)-3-hydroxyflavones. *J. Phys. Chem. A* **107**, 9522–9529 (2003).
166. Reichardt, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.* **94**, 2319–2358 (1994).
167. Marini, A., Muñoz-Losa, A., Biancardi, A. & Mennucci, B. What is Solvatochromism? *J. Phys. Chem. B* **114**, 17128–17135 (2010).
168. Klymchenko, A. S., Pivovarenko, V. G. & Demchenko, A. P. Perturbation of planarity as the possible mechanism of solvent-dependent variations of fluorescence quantum yield in 2-aryl-3-hydroxychromones. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **59**, 787–792 (2003).
169. Gunduz, S., Goren, A. C. & Ozturk, T. Facile Syntheses of 3-Hydroxyflavones. *Org. Lett.* **14**,

- 1576–1579 (2012).
170. Tseng, H.-W. *et al.* Excited-state intramolecular proton-transfer reaction demonstrating anti-Kasha behavior. *Chem. Sci.* **7**, 655–665 (2016).
171. Lapouge, C., Dangleterre, L. & Cornard, J. Spectroscopic and Theoretical Studies of the Zn (II) Chelation with Hydroxyflavones. *J. Phys. Chem. A* **110**, 12494–12500 (2006).
172. Zhang, W., Shi, B. & Shi, J. Time-dependent density functional investigation on electronic spectra of 4'-N-dimethylamino-3-hydroxyflavone. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **731**, 219–224 (2005).
173. Vandenberg, W., Leutenegger, M., Lasser, T., Hofkens, J. & Dedecker, P. Diffraction-unlimited imaging: from pretty pictures to hard numbers. *Cell Tissue Res.* **360**, 151–178 (2015).
174. Nicovich, P. R., Owen, D. M. & Gaus, K. Turning single-molecule localization microscopy into a quantitative bioanalytical tool. *Nat. Protoc.* **12**, 453–461 (2017).
175. Dunn, K. W., Kamocka, M. M. & McDonald, J. H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol. Physiol.* **300**, C723–C742 (2011).
176. Sherman, E., Barr, V. A. & Samelson, L. E. Resolving multi-molecular protein interactions by photoactivated localization microscopy. *Methods* **59**, 261–269 (2013).
177. Rossy, J., Cohen, E., Gaus, K. & Owen, D. M. Method for co-cluster analysis in multichannel single-molecule localisation data. *Histochem. Cell Biol.* **141**, 605–612 (2014).
178. Rubin-Delanchy, P. *et al.* Bayesian cluster identification in single-molecule localization microscopy data. *Nat. Methods* **12**, 1072 (2015).
179. Bermudez-Hernandez, K. *et al.* A Method for Quantifying Molecular Interactions Using Stochastic Modelling and Super-Resolution Microscopy. *Sci. Rep.* **7**, 14882 (2017).
180. Valdez, G. R. Development of CRF1receptor antagonists as antidepressants and anxiolytics: Progress to date. *CNS Drugs* **20**, 887–896 (2006).
181. Fleck, B. & Hoare, S. Binding Kinetics Redefine the Antagonist Pharmacology of the Corticotropin-Releasing Factor Type 1 Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**, 518–531 (2012).
182. Chen, Y. L. *et al.* 2-Aryloxy-4-alkylaminopyridines: Discovery of novel corticotropin-releasing factor 1 antagonists. *J. Med. Chem.* **51**, 1385–1392 (2008).
183. Wootten, D., Simms, J., Miller, L. J., Christopoulos, A. & Sexton, P. M. Polar transmembrane interactions drive formation of ligand-specific and signal pathway-biased family B G protein-coupled receptor conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 5211 LP–5216 (2013).
184. Petrov, R. R. *et al.* Mastering tricyclic ring systems for desirable functional cannabinoid activity. *Eur. J. Med. Chem.* **69**, 881–907 (2013).
185. Wang, Y. W., Descalzo, A. B., Shen, Z., You, X. Z. & Rurack, K. Dihydronaphthalene-fused boron-dipyrromethene (BODIPY) dyes: Insight into the electronic and conformational tuning modes of BODIPY fluorophores. *Chem. Eur. J.* **16**, 2887–2903 (2010).

186. Boens, N., Leen, V. & Dehaen, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1130–1172 (2012).
187. Wagner, R. W. & Lindsey, J. S. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. *Pure Appl. Chem* **68**, 1373–1380 (1996).
188. López Arbeloa, F., Bañuelos Prieto, J., Martínez Martínez, V., Arbeloa López, T. & López Arbeloa, I. Intramolecular charge transfer in pyrromethene laser dyes: Photophysical behaviour of PM650. *ChemPhysChem* **5**, 1762–1771 (2004).
189. Magde, D., Wong, R. & Seybold, P. G. Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields. *Photochem. Photobiol.* **75**, 327–334 (2007).
190. Gut, A. *et al.* Photophysics and redox properties of aza-BODIPY dyes with electron-withdrawing groups. *New J. Chem.* **41**, 12110–12122 (2017).
191. Lagerström, M. C. & Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 339–357 (2008).
192. Schnell, U., Dijk, F., Sjollem, K. A. & Giepmans, B. N. G. Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nat. Methods* **9**, 152–158 (2012).

Apéndice I: Espectroscopía de RMN, espectrometría de masa y cromatografía líquida

En este apéndice se presentan espectros de RMN y de masa de los distintos compuestos presentados en el Capítulo 4. También se muestra el cromatograma de UPLC que muestra la pureza del ABP-09.

2. Espectroscopía RMN

- **Compuesto 1.** Asignación: ^1H RMN (Figura AI.1.A, 500 MHz, cloroformo-d) δ 7.85 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 8.5, 2.2$, 1H), 6.65 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 2.41 (s, 3H). ^{13}C RMN (Figura AI.1.B, 126 MHz, cloroformo-d) δ 198.01, 137.90, 136.59, 135.66, 131.29, 130.05, 129.82, 128.30, 127.70, 27.40.
- **Compuesto 2.** Asignación: ^1H RMN (Figura AI.2.A, 500 MHz, cloroformo-d) δ 7.42 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.23 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.74 (dd, $J = 6.6, 1.8$ Hz, 2H), 4.40 (dq, $J = 7.8, 6.3$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 18.2, 7.8$ Hz, 1H), 2.94 (dd, $J = 18.1, 6.0$ Hz, 1H), 2.17 (s, 3H). ^{13}C RMN (Figura AI.2.B, 126 MHz, cloroformo-d) δ 198.01, 137.90, 136.59, 135.66, 131.29, 130.05, 129.82, 128.30, 127.70, 27.40.
- **Compuesto 2a.** Asignación: ^1H RMN (Figura AI.3, 500 MHz, cloroformo-d) δ 8.01 (s.a, 1H), 7.41 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H), 7.08 (dd, $J = 2.7, 1.7$ Hz, 1H), 6.21 (ddt, $J = 2.7, 1.7, 0.9$ Hz, 1H), 2.32 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H).

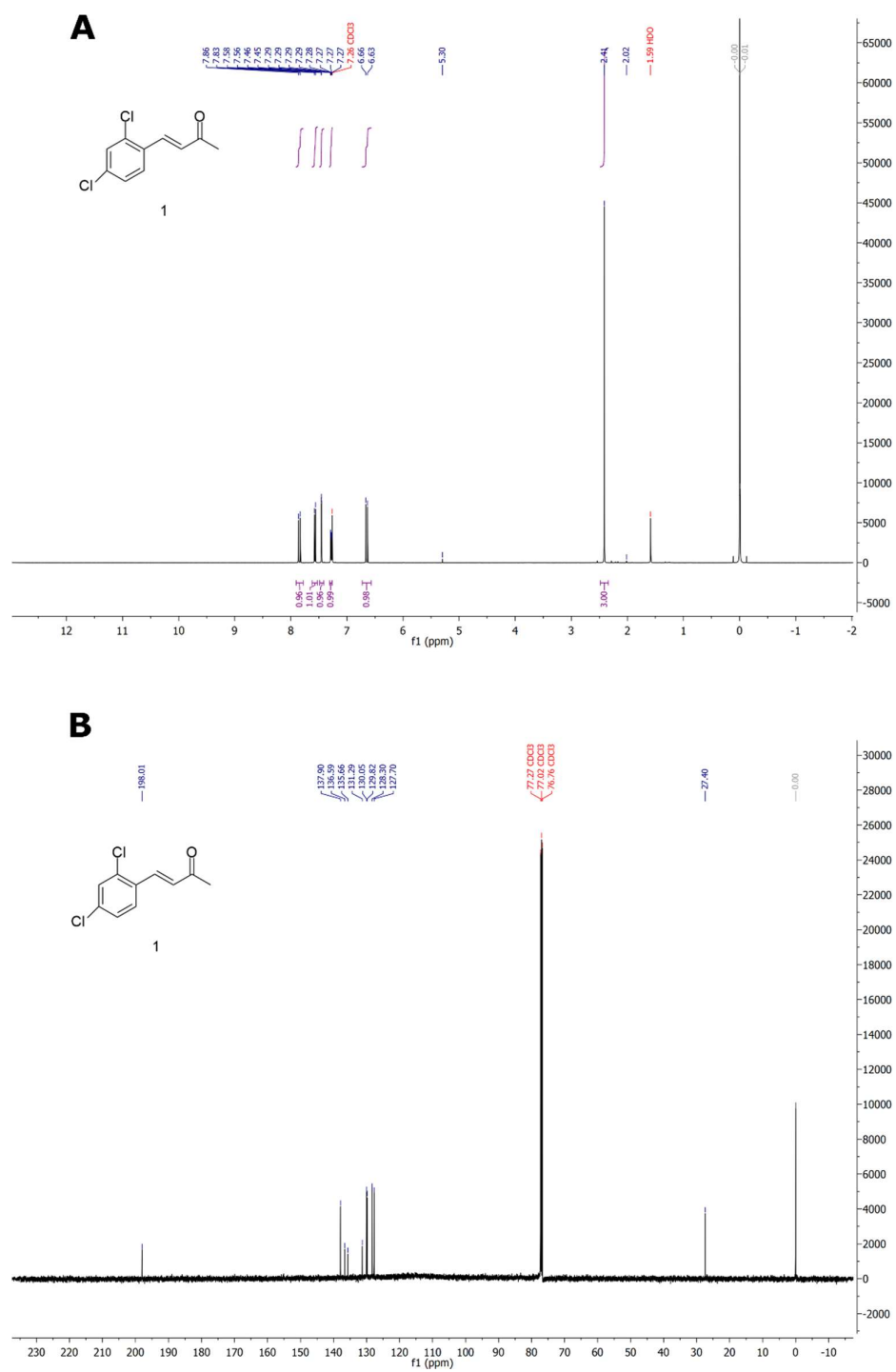


Figura AI.1. (A): Espectro de RMN protónico de **1**. (B): Espectro ¹³C de RMN de **1**.

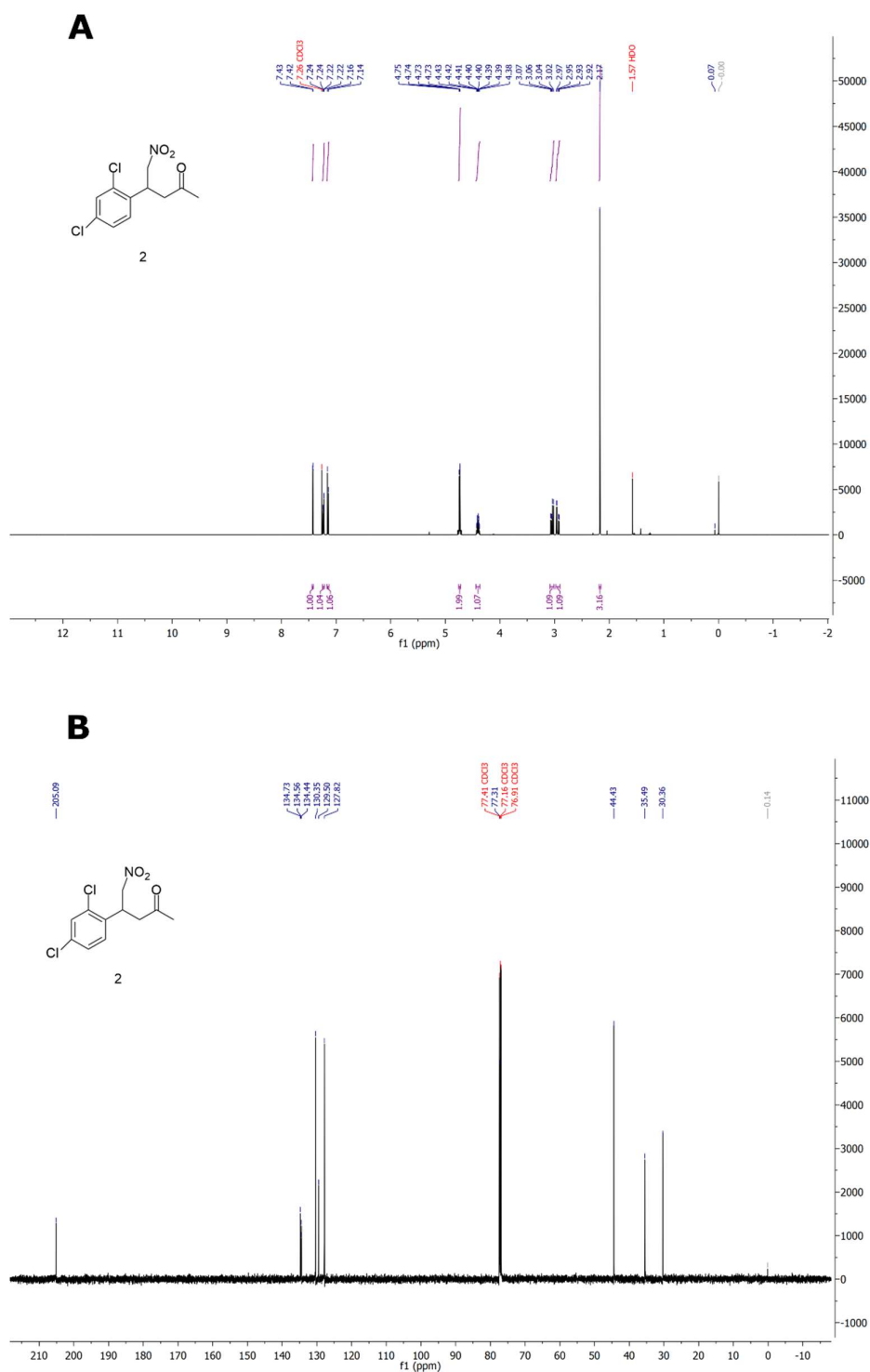


Figura A1.2. (A): Espectro de RMN protónico de **2**. (B): Espectro ^{13}C de RMN de **2**.

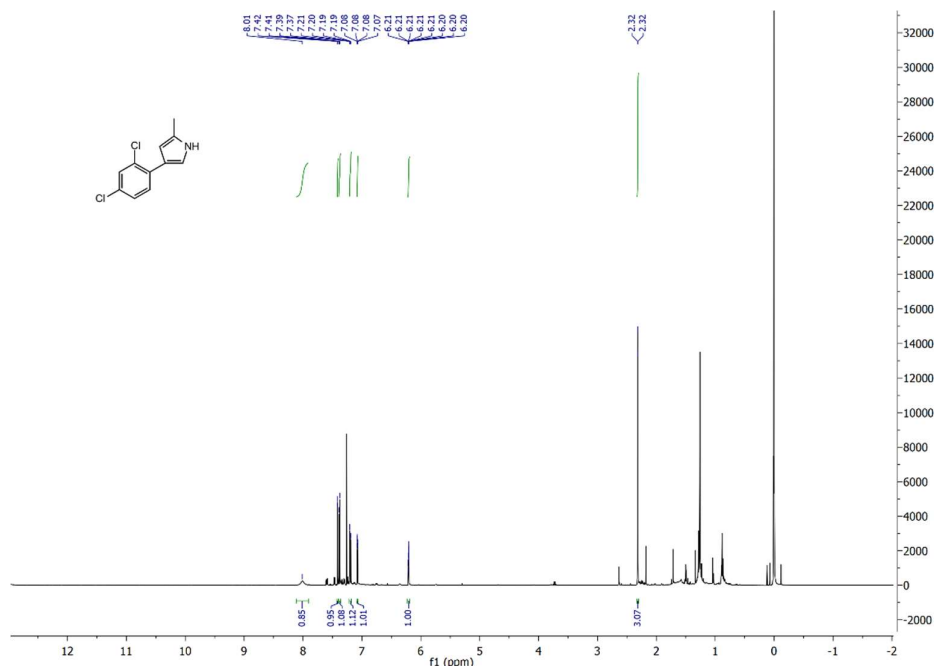


Figura AI.3. Espectro de RMN protónico de 2a.

3. Espectrometría de masa

- **Compuesto 1.** Condiciones de ionización: Modo: ESI⁻; Voltaje capilar: 2,3 kV; Voltaje cono: 30 V; Temperatura de la fuente: 120°C; Temperatura de desolvatación: 300°C; Flujo del gas del cono: 0 L/h; Flujo del gas de desolvatación: 400 L/h. Masa esperada: 212,9874; Masa hallada: 212,9878. El espectro se presenta en la Figura AI.4.
- **Compuesto 2.** Condiciones de ionización: Modo: ESI⁻; Voltaje capilar: 2,3 kV; Voltaje cono: 30 V; Temperatura de la fuente: 120°C; Temperatura de desolvatación: 300°C; Flujo del gas del cono: 0 L/h; Flujo del gas de desolvatación: 400 L/h. Masa esperada: 274,0038; Masa hallada: 274,0036. El espectro se presenta en la Figura AI.5.
- **Compuesto 3.** Condiciones de ionización: Modo: ESI⁺; Voltaje capilar: 2,5 kV; Voltaje cono: 30 V; Temperatura de la fuente: 120°C; Temperatura de desolvatación: 300°C; Flujo del gas del cono: 10 L/h; Flujo del gas de desolvatación: 600 L/h. Masa esperada: 332,0721; Masa hallada: 332,0721. El espectro se presenta en la Figura AI.6.
- **ABP-09:** Condiciones de ionización: Modo: ESI⁻; Voltaje capilar: 2,3 kV; Voltaje cono: 30 V; Temperatura de la fuente: 120°C; Temperatura de desolvatación: 300°C; Flujo del gas del cono: 10 L/h; Flujo del gas de desolvatación: 600 L/h. Masa esperada: 377,0584; Masa hallada: 377,0587. El espectro se presenta en la Figura 4.9 (Capítulo 4).

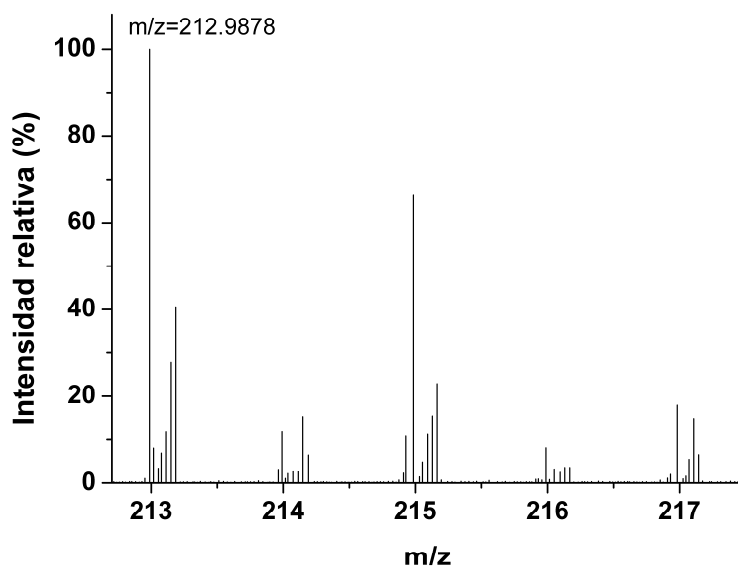


Figura A1.4. Espectro de masa ESI⁻ de alta resolución del compuesto 1.

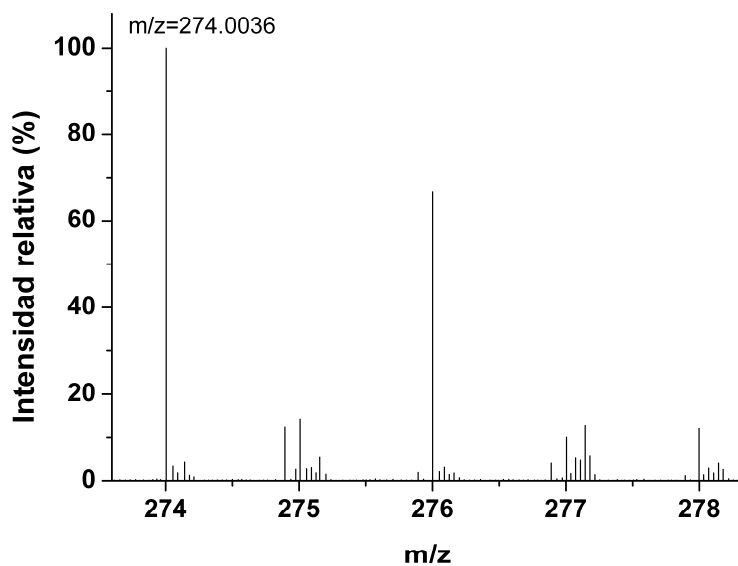


Figura A1.5. Espectro de masa ESI⁻ de alta resolución del compuesto 2.

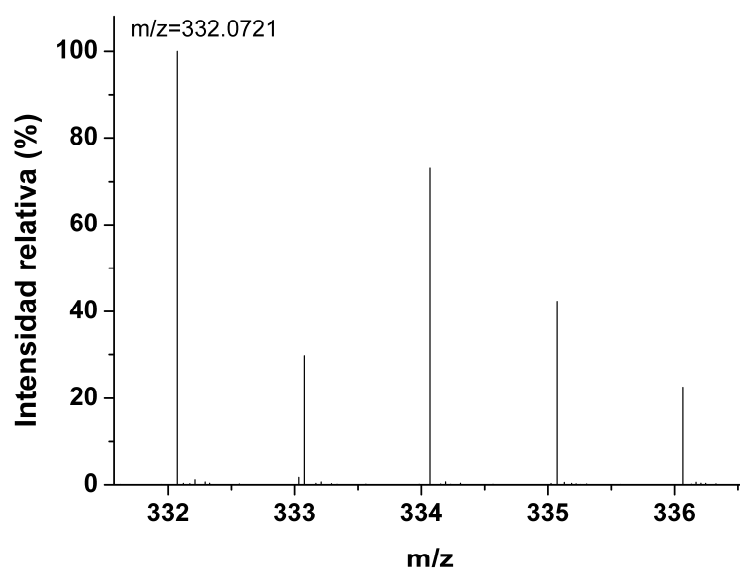


Figura AI.6. Espectro de masa ESI⁺ de alta resolución del compuesto 3.

4. Cromatografía UPLC

A continuación, se presenta el cromatograma de UPLC de ABP-09, junto a los cromatogramas de control (solvente e inyección de volumen cero). En todos los casos se muestra el cromatograma de corriente iónica total, mientras que para la muestra (ABP-09) también se incluye el correspondiente a la masa 377,058 (es un pico asociado a ABP-09 en modo negativo). Se puede apreciar que el compuesto se encuentra puro. Las condiciones de ionización fueron las presentadas en el inciso anterior, mientras que el gradiente y flujo de fase móvil fueron descriptos en el Capítulo 2.

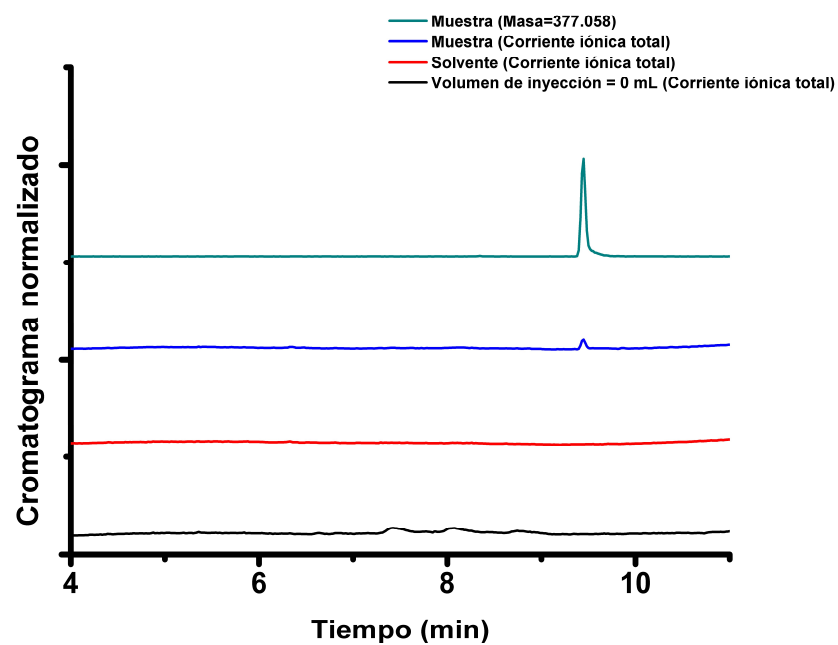


Figura A1.6. Cromatograma UPLC de ABP-09 y sus controles.

Apéndice II: Ejemplos de deconvolución espectral de 3-HC

En este apéndice se presentan a modo de ejemplo la deconvolución de los espectros de emisión de los compuestos **1** (Figura AII.1) y **2** (Figura AII.2) del Capítulo 3 a 15°C en diclorometano. Para el primer caso, se muestra la banda N* en verde, la T₁* en rojo y la T₂* en azul. Para el segundo, la N* corresponde al color verde y la única banda T* figura en rojo. En ambos casos se presenta en negro la suma de las componentes gaussianas y en línea punteada naranja el espectro experimental. Los espectros se presentan en función del número de onda.

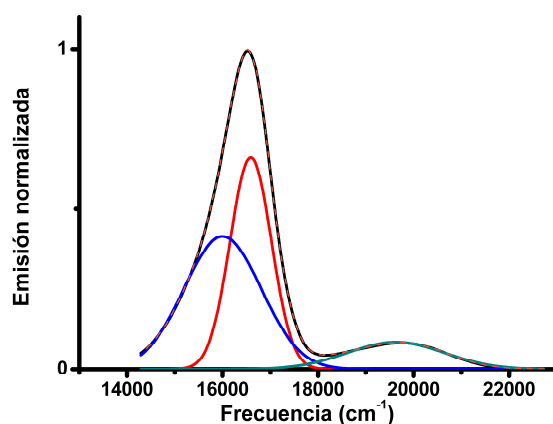


Figura AII.1. Deconvolución del espectro de emisión de **1** en DCM a 15°C. Azul: banda T₂*; rojo: banda T₁*; verde: banda N*; negro: espectro experimental; naranja punteado: suma de las tres componentes gaussianas.

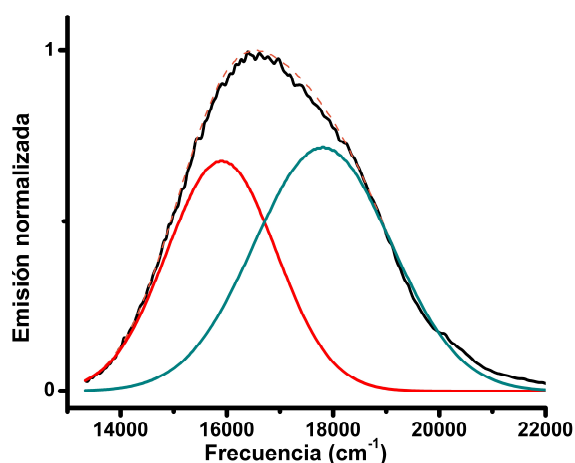


Figura AII.1. Deconvolución del espectro de emisión de **2** en DCM a 15°C. Rojo: banda T*; verde: banda N*; negro: espectro experimental; naranja punteado: suma de las dos componentes gaussianas.

Apéndice III: Códigos de *Matlab* utilizados para el conteo de pares *ij* y para simular distribuciones en 2D de moléculas de tipo A y tipo B

Aquí se presenta el código de *Matlab* utilizado para contabilizar pares AA, AB y BB y el número de A y B libres, así como también el que se usó para generar distribuciones con constantes de afinidad K_{AA}' , K_{AB}' y K_{BB}' . La aplicación de los mismos figura en el inciso 2.5.2.1 del Capítulo 4. En ambos programas se calculan las cuatro FDAC (AA, AB, BA y BB) de las distribuciones con las que se trabaja: en el de conteo de pares se cargan las localizaciones manualmente, mientras que el otro código genera las localizaciones según las constantes ingresadas. En el Apéndice IV se analiza con mayor detalle la utilidad de las FDAC.

Programa para el conteo de pares

```
function alan (Ax,Ay,Bx,By)
minax=min(Ax);minbx=min(Bx);minx=min(minax,minbx);
minay=min(Ay);minby=min(By);miny=min(minay,minby);
Ax=Ax-minx+1;Ay=Ay-miny+1;
Bx=Bx-minx+1;By=By-miny+1;

a=[Ax Ay];a=a';
b=[Bx By];b=b';

%
dim=[202 202];
nm=[size(a,2) size(b,2)];Na=nm(1);Nb=nm(2);
az=[a(1,:);a(2,:)];
saz2=size(az,2);
ssa=ones(1,saz2);
PPa=sparse(az(1,:),az(2,:),ssa,dim(1),dim(2));

bz=[b(1,:);b(2,:)];
sbz2=size(bz,2);
ssb=ones(1,sbz2);
PPb=sparse(bz(1,:),bz(2,:),ssb,dim(1),dim(2));
PPa=full(PPa);PPb=full(PPb);
PP=PPa+3*PPb;
figure(1)
imagesc(PP,[0,4]);figure(gcf)
%pause

% Identificación de las moléculas aisladas y de los pares
vecinosa=zeros(nm(1),5); vecinosb=zeros(nm(2),5);
% Se estudian los vecinos de cada molécula de A
% La salida es una matriz, vecinosa, que contiene 5 columnas con:
% 1: índice de la molécula A
% 2: número de moléculas A en los píxeles vecinos
% 3: Ídem de moléculas B
% 4: índice de la molécula A más cercana
% 5: índice de la molécula B más cercana
for k=1:nm(1);
```

```

dab=( (b(1,:)-a(1,k)).^2+(b(2,:)-a(2,k)).^2).^ (1/2);
daa=( (a(1,:)-a(1,k)).^2+(a(2,:)-a(2,k)).^2).^ (1/2);
[dmab,iab]=sort(dab);[dmaa,iaa]=sort(daa);
dmabs=-sign(dmab-sqrt(2));dmaas=-sign(dmaa-sqrt(2));
ddmmab=roicolor(dmabs,0,1);nabs=sum(ddmmab);
ddmmaa=roicolor(dmaas,0,1);naas=sum(ddmmaa)-1;
vecinosa(k,:)=[k naas nabs iaa(2) iab(1)];
mindista(k)=dmaa(2);mindistab(k)=dmab(1);
end
dma =sort(mindista);dmmab=sort(mindistab);
inda=(1:1:length(dma));indab=(1:1:length(dmmab));
inda=inda/length(dma);indab=1-inda;
indab=indab/length(dmmab);indab=1-indab;

% Se estudian los vecinos de cada molécula de B
% La salida es una matriz, vecinosa, con la misma estructura que para
las
% moléculas de A
for k=1:nm(2);
    dba=( (b(1,k)-a(1,:)).^2+(b(2,k)-a(2,:)).^2).^ (1/2);
    dbb=( (b(1,k)-b(1,:)).^2+(b(2,k)-b(2,:)).^2).^ (1/2);
    dmbs=sort(dba);dmbsb=sort(dbb);
    [dmbs,ibs]=sort(dmbs);[dmbsb,ibb]=sort(dmbb);
    dmbs=-sign(dmbs-sqrt(2));dmbsb=-sign(dmbsb-sqrt(2));
    ddmmbs=roicolor(dmbs,0,1);nbbs=sum(ddmmbs);
    ddmmbsb=roicolor(dmbsb,0,1);nbbsb=sum(ddmmbsb)-1;
    vecinosa(k,:)=[k nbbs nbbsb ibs(1) ibb(2)];
    mindistb(k)=dmbsb(2);mindistba(k)=dmbs(1);
end
dmmbs =sort(mindistb);dmmbsa=sort(mindistba);
indb=(1:1:length(dmmbs));indba=(1:1:length(dmmbsa));
indb=indb/length(dmmbs);indb=1-indb;
indba=indba/length(dmmbsa);indba=1-indba;

%cálculo de A libre
clustera=vecinosa(:,2)+ vecinosa(:,3);
cla=roicolor(clustera,0);alibre=sum(cla)

%cálculo de B libre
clusterb=vecinosa(:,2)+ vecinosa(:,3);
clb=roicolor(clusterb,0);
blibre=sum(clb)

%Cómputo de los pares AB y de los dímeros A2 y B2
% Se toma el criterio de que molécula de A rodeada por mayor cantidad de
% moléculas similares es un dímero A2, mientras que en caso contrario,
es
% un par AB (si tiene igual nro de A que de B o si no tiene A)
%Una situación simétrica se usa para B
bconvec=vecinosa(find(roicolor(clusterb,1,100)),:);
aconvec=vecinosa(find(roicolor(clustera,1,100)),:);
bmenos=aconvec(:,3)-aconvec(:,2);
amenos=bconvec(:,2)-bconvec(:,3);
sa=sign(bmenos);sb=sign(amenos);
pa=[sum(roicolor(sa,-1)) sum(roicolor(sa,0)) sum(roicolor(sa,1))];
pb=[sum(roicolor(sb,-1)) sum(roicolor(sb,0)) sum(roicolor(sb,1))];
paresa=(pa(1)+pa(2)/2)/2
paresb=(pb(1)+pb(2)/2)/2
paresab=(pa(2)/2+pa(3)+pb(3)+pb(2)/2)/2

```

```
figure(2)
plot(dma.^2,log10(inda),'ro',dmmab.^2,log10(indab),'rx',dmmba.^2,log10(indba),'bx',dmmbb.^2,log10(indb),'bo');figure(gcf)

end

function dimeros (Na,Nb,kab,ka2,kb2)
    global vecinosa vecinosb veaa vebb
    % La rutina genera puntos de dos tipos, a y b Los que se distribuyen en
    % posiciones al azar
    % dentro de un cuadrado de 250 x 250 píxeles.
    % En base a las constantes de asociación kab, ka2 y kb2, se claculan
    % por iteración, las cantidades de equilibrio de A y B libres, pares AB,
    % A2
    % y B2. Se ubican al azar las moléculas de A y junto a ellas se ubican
    % primero las de A que están asociadas con ellas, luego las de B
    % asociadas
    % y por último las de B libres, las que se asoican con las de B.
    % La asociación se considera dentro del punto donde se ubica la molécula
    % y
    % los 8 píxeles primeros vecinos
    %
    dim=[200 200];
    nm=[Na Nb];
    %se establecen los valores iniciales de A y B libres (na y nb,
    %respectivamente) para iniciar la iteración del cálculo de las
    %concentraciones
    nab=(kab*(Na+Nb)+1)/(2*kab)-(((kab*(Na+Nb)+1)/(2*kab))^2-Na*Nb)^(1/2);
    nab=round(nab);nb=Nb-nab;na=Na-nab;
    na=round(Na/(1+kab*nb+2*ka2*na));
    nb=round(0.5*(na+Nb-nab));
    %iteración para encontrar las concentraciones considerando los tres
    %equilibrios
    %for kj=1:10;
        for jj=1:40;
            naref=na;
            na=Na/(1+kab*nb+2*ka2*na);
            nb=Nb/(1+kab*na+2*kb2*nb);
        end
        % if ((abs(na-naref))<=0.1) then end
        % else
        % end
    %calcula las demás concentraciones por proporciones y por diferencia
    na=round(na)
    nb=round(nb)
    nab=round(Nb*kab*na/(1+kab*na+2*kb2*nb))
    na2=round(0.5*(Na-na-nab))
    nb2=round(0.5*(Nb-nb-nab))

    %na+2*na2+nab
    %nb+2*nb2+nab
    %pause

    %primero se ubican aleatoriamente las Nb-Nb2 moléculas de B que están
    %asociadas
    %con A y con B. nb2 moléculas de B están formado dímeros de B
```



```

b=[ceil(dim(1)*rand(1,(Nb)));ceil(dim(2)*rand(1,(Nb)))];
arn=[ceil(dim(1)*rand(1,(Na)));ceil(dim(2)*rand(1,(Na)))];
brn=b;
[dim1,dim2]=size(b);
%Se ubican las moléculas de A que se asocian a las de B
for k=1:nab;
    a(1,k)=ceil(b(1,k)+round(3*(rand-0.5)));
    a(2,k)=ceil(b(2,k)+round(3*(rand-0.5)));
end
for k=nab+1:nab+nb2;
    b(1,k+nb2)=ceil(b(1,k)+round(3*(rand-0.5)));
    b(2,k+nb2)=ceil(b(2,k)+round(3*(rand-0.5)));
end
for k=nab+1:Na;
    a(1,k)=ceil(dim(1)*rand);a(2,k)=ceil(dim(2)*rand);
end
for k=nab+1:nab+na2;
    a(1,k+na2)=ceil(a(1,k)+round(3*(rand-0.5)));
    a(2,k+na2)=ceil(a(2,k)+round(3*(rand-0.5)));
end

aar=roicolor(a,1,dim(1));
sa=sum(aar);sar=roicolor(sa,2);
ind=find(sar);
az=[a(1,ind);a(2,ind)];
saz2=size(az,2);
ssa=ones(1,saz2);
PPa=sparse(az(1,:),az(2,:),ssa,dim(1),dim(2));
bbr=roicolor(b,1,dim(1));
sb=sum(bbr);sbr=roicolor(sb,2);
ind=find(sbr);
bz=[b(1,ind);b(2,ind)];
sbz2=size(bz,2);
ssb=ones(1,sbz2);
PPb=sparse(bz(1,:),bz(2,:),ssb,dim(1),dim(2));
PPa=full(PPa);PPb=full(PPb);
PP=PPa+3*PPb;
figure(1)
imagesc(PP,[0,4]);colormap;figure(gcf)
% Identificación de las moléculas aisladas y de los pares
vecinosa=zeros(nm(1),5); vecinoseb=zeros(nm(2),5);
% Se estudian los vecinos de cada molécula de A
% La salida es una matriz, vecinosa, que contiene 5 columnas con:
% 1: índice de la molécula A
% 2: número de moléculas A en los píxeles vecinos
% 3: ídem de moléculas B
% 4: índice de la molécula A más cercana
% 5: índice de la molécula B más cercana
for k=1:nm(1);
    dab=((b(1,:)-a(1,k)).^2+(b(2,:)-a(2,k)).^2).^(1/2);
    daa=((a(1,:)-a(1,k)).^2+(a(2,:)-a(2,k)).^2).^(1/2);
    [dmab,iab]=sort(dab);[dmaa,iaa]=sort(daa);
    dmabs=-sign(dmab-sqrt(2));dmaas=-sign(dmaa-sqrt(2));
    ddmab=roicolor(dmabs,0,1);nabs=sum(ddmab);
    ddmmaa=roicolor(dmaas,0,1);naas=sum(ddmmaa)-1;
    vecinosa(k,:)=[k naas nabs iaa(2) iab(1)];

    mindista(k)=dmaa(2);mindistab(k)=dmab(1);
end
dma =sort(mindista);dmnab=sort(mindistab);
inda=(1:1:length(dma));indab=(1:1:length(dmnab));

```

```

inda=inda/length(dma);inda=1-inda;
indab=indab/length(dmmab);indab=1-indab;

[C ia ic]=unique(vecinosa(:,4),'rows');
veca=vecinosa(ia,:);
[C ia ic]=unique(veca(:,5),'rows');
veaa=veca(ia,:);

% Se estudian los vecinos de cada molécula de B
% La salida es una matriz, vecinosb, con la misma estructura que para
las
% moléculas de A
for k=1:nm(2);
    dba=( (b(1,k)-a(1,:)).^2+(b(2,k)-a(2,:)).^2 ).^(1/2);
    dbb=( (b(1,k)-b(1,:)).^2+(b(2,k)-b(2,:)).^2 ).^(1/2);
    [dmba,iba]=sort(dba);[dmdbb,ibb]=sort(dbb);
    dmbas=-sign(dmba-sqrt(2));dmdbbs=-sign(dmdbb-sqrt(2));
    ddmmba=roicolor(dmbas,0,1);nbas=sum(ddmmba);
    ddmdbb=roicolor(dmdbbs,0,1);nbbs=sum(ddmmbb)-1;
    vecinosb(k,:)=[k nbas nbbs iba(1) ibb(2)];

    mindistb(k)=dmdbb(2);mindistba(k)=dmba(1);
end
dmdbb =sort(mindistb);dmmmba=sort(mindistba);
indb=(1:1:length(dmdbb));indba=(1:1:length(dmmmba));
%indb=indb';indba=indba';
indb=indb/length(dmdbb);indb=1-indb;
indba=indba/length(dmmmba);indba=1-indba;

[C ia ic]=unique(vecinosb(:,4),'rows');
vecb=vecinosb(ia,:);
[C ia ic]=unique(vecb(:,5),'rows');
vebb=vecb(ia,:);

%cálculo de A libre
clustera=vecinosa(:,2)+ vecinosa(:,3);
cla=roicolor(clustera,0);alibre=sum(cla)

%cálculo de B libre
clusterb=vecinosb(:,2)+ vecinosb(:,3);
clb=roicolor(clusterb,0);
blibre=sum(clb)

%Cómputo de los pares AB y de los dímeros A2 y B2
% Se toma el criterio de que molécula de A rodeada por mayor cantidad de
% moléculas similares es un dímero A2, mientras que en caso contrario,
es
% un par AB (si tiene igual nro de A que de B o si no tiene A)
%Una situación simétrica se usa para B
bconvec=vecinosb(find(roicolor(clusterb,1,100)),:);
aconvec=vecinosa(find(roicolor(clustera,1,100)),:);
bmenosa=aconvec(:,3)-aconvec(:,2);
amenosb=bconvec(:,2)-bconvec(:,3);
sa=sign(bmenosa);sb=sign(amenosb);
pa=[sum(roicolor(sa,-1)) sum(roicolor(sa,0)) sum(roicolor(sa,1))];
pb=[sum(roicolor(sb,-1)) sum(roicolor(sb,0)) sum(roicolor(sb,1))];
paresa=(pa(1)+pa(2)/2)/2

```

```

paresb=(pb(1)+pb(2)/2)/2
paresab=(pa(2)/2+pa(3)+pb(3)+pb(2)/2)/2

%Esta porción calcula la distribución de distancias en una muestra
%aleatoria de la misma densidad de A y de B para graficarlas como marco
%de
%referencia

for k=1:Na;
    darbr=((brn(1,:)-arn(1,k)).^2+(brn(2,:)-arn(2,k)).^2).^(1/2);
    [dmabr,iarbr]=sort(darbr);
    mindistarbr(k)=dmabr(1);
end
dmarbr =sort(mindistarbr);dmabr=dmarbr(1:Na-1);
indarbr=(1:1:length(dmarbr));
indarbr=indarbr/length(dmarbr);iarbr=indarbr(1:(Na-1));iarbr=1-iarbr;

for k=1:Nb;
    dbrar=((brn(1,k)-arn(1,:)).^2+(brn(2,k)-arn(2,:)).^2).^(1/2);
    [dmbar,ibrar]=sort(dbrar);
    mindistbrar(k)=dmbar(1);
end
dmbrar =sort(mindistbrar);dmbar=dmbrar(1:Nb-1);
indbrar=(1:1:length(dmbrar));
indbrar=indbrar/length(dmbrar);ibrar=indbrar(1:(Nb-1));ibrar=1-ibrar;

pab=polyfit(dmabr.^2,log10(iarbr),1);
calarbr=pab(1)*(dmabr.^2)+pab(2);

pba=polyfit(dmbar.^2,log10(ibrar),1);
calbrar=pba(1)*(dmbar.^2)+pba(2);

figure(2)
plot(dma.^2,log10(inda),'ro',dmmab.^2,log10(indab),'rx',dmmba.^2,log10(
indba),'bx',dmmbb.^2,log10(indb),'bo');figure(gcf)
hold on
plot(dmabr.^2,calarbr,'r',dmbar.^2,calbrar,'b');figure(gcf)
hold off

end

```

Programa para la simulación de distribuciones 2D con constantes de afinidad K_{AA}' , K_{BB}' y K_{AB}'

```

function dimeros (Na,Nb,kab,ka2,kb2)
    global vecinosa vecinosb veaa vebb
    % La rutina genera puntos de dos tipos, a y b Los que se distribuyen en
    % posiciones al azar
    % dentro de un cuadrado de 250 x 250 píxeles.
    % En base a las constantes de asociación kab, ka2 y kb2, se claculan
    % por iteración, las cantidades de equilibrio de A y B libres, pares AB,
    % A2
    % y B2. Se ubican al azar las moléculas de A y junto a ellas se ubican
    % primero las de A que están asociadas con ellas, luego las de B
    % asociadas
    % y por último las de B libres, las que se asoican con las de B.

```

```
% La asociación se considera dentro del punto donde se ubica la molécula
y
% los 8 píxeles primeros vecinos
%
dim=[200 200];
nm=[Na Nb];
%se establecen los valores iniciales de A y B libres (na y nb,
%respectivamente) para iniciar la iteración del cálculo de las
%concentraciones
nab=(kab*(Na+Nb)+1)/(2*kab)-(((kab*(Na+Nb)+1)/(2*kab))^2-Na*Nb)^(1/2);
nab=round(nab);nb=Nb-nab;na=Na-nab;
na=round(Na/(1+kab*nb+2*ka2*na));
nb=round(0.5*(na+Nb-nab));
%iteración para encontrar las concentraciones considerando los tres
%equilibrios
%for kj=1:10;
    for jj=1:40;
        naref=na;
        na=Na/(1+kab*nb+2*ka2*na);
        nb=Nb/(1+kab*na+2*kb2*nb);
    end
    % if ((abs(na-naref))<=0.1) then end
    % else
    % end
%calcula las demás concentraciones por proporciones y por diferencia
na=round(na)
nb=round(nb)
nab=round(Nb*kab*na/(1+kab*na+2*kb2*nb))
na2=round(0.5*(Na-na-nab))
nb2=round(0.5*(Nb-nb-nab))

%na+2*na2+nab
%nb+2*nb2+nab
%pause

%primero se ubican aleatoriamente las Nb-Nb2 moléculas de B que están
asociadas
%con A y con B. nb2 moléculas de B están formado dímeros de B
b=[ceil(dim(1)*rand(1,(Nb)));ceil(dim(2)*rand(1,(Nb)))];
arn=[ceil(dim(1)*rand(1,(Na)));ceil(dim(2)*rand(1,(Na)))];
brn=b;
[dim1,dim2]=size(b);
%Se ubican las moléculas de A que se asocian a las de B
for k=1:nab;
    a(1,k)=ceil(b(1,k)+round(3*(rand-0.5)));
    a(2,k)=ceil(b(2,k)+round(3*(rand-0.5)));
end
for k=nab+1:nab+nb2;
    b(1,k+nb2)=ceil(b(1,k)+round(3*(rand-0.5)));
    b(2,k+nb2)=ceil(b(2,k)+round(3*(rand-0.5)));
end
for k=nab+1:Na;
    a(1,k)=ceil(dim(1)*rand);a(2,k)=ceil(dim(2)*rand);
end
for k=nab+1:nab+na2;
    a(1,k+na2)=ceil(a(1,k)+round(3*(rand-0.5)));
    a(2,k+na2)=ceil(a(2,k)+round(3*(rand-0.5)));
end
```

```

aar=roicolor(a,1,dim(1));
sa=sum(aar);sar=roicolor(sa,2);
ind=find(sar);
az=[a(1,ind);a(2,ind)];
saz2=size(az,2);
ssa=ones(1,saz2);
PPa=sparse(az(1,:),az(2,:),ssa,dim(1),dim(2));
bbr=roicolor(b,1,dim(1));
sb=sum(bbr);sbr=roicolor(sb,2);
ind=find(sbr);
bz=[b(1,ind);b(2,ind)];
sbz2=size(bz,2);
ssb=ones(1,sbz2);
PPb=sparse(bz(1,:),bz(2,:),ssb,dim(1),dim(2));
PPa=full(PPa);PPb=full(PPb);
PP=PPa+3*PPb;
figure(1)
imagesc(PP,[0,4]);colormap;figure(gcf)
% Identificación de las moléculas aisladas y de los pares
vecinosa=zeros(nm(1),5); vecinosb=zeros(nm(2),5);
% Se estudian los vecinos de cada molécula de A
% La salida es una matriz, vecinosa, que contiene 5 columnas con:
% 1: índice de la molécula A
% 2: número de moléculas A en los píxeles vecinos
% 3: Ídem de moléculas B
% 4: índice de la molécula A más cercana
% 5: índice de la molécula B más cercana
for k=1:nm(1);
    dab=((b(1,:)-a(1,k)).^2+(b(2,:)-a(2,k)).^2).^(1/2);
    daa=((a(1,:)-a(1,k)).^2+(a(2,:)-a(2,k)).^2).^(1/2);
    [dmab,iab]=sort(dab);[dmaa,iaa]=sort(daa);
    dmabs=-sign(dmab-sqrt(2));dmaas=-sign(dmaa-sqrt(2));
    ddmmb=roicolor(dmabs,0,1);nabs=sum(ddmmb);
    ddmmaa=roicolor(dmaas,0,1);naas=sum(ddmmaa)-1;
    vecinosa(k,:)=[k naas nabs iaa(2) iab(1)];

    mindista(k)=dmaa(2);mindistab(k)=dmab(1);
end
dma =sort(mindista);dmmab=sort(mindistab);
inda=(1:1:length(dma));indab=(1:1:length(dmmab));
inda=inda/length(dma);inda=1-inda;
indab=indab/length(dmmab);indab=1-indab;

[C ia ic]=unique(vecinosa(:,4),'rows');
veca=vecinosa(ia,:);
[C ia ic]=unique(veca(:,5),'rows');
veaa=veca(ia,:);

% Se estudian los vecinos de cada molécula de B
% La salida es una matriz, vecinosb, con la misma estructura que para
las
% moléculas de A
for k=1:nm(2);
    dba=((b(1,k)-a(1,:)).^2+(b(2,k)-a(2,:)).^2).^(1/2);
    dbb=((b(1,k)-b(1,:)).^2+(b(2,k)-b(2,:)).^2).^(1/2);
    [dmba,iba]=sort(dba);[dmdbb,ibb]=sort(dbb);
    dmbas=-sign(dmba-sqrt(2));dmbbs=-sign(dmdbb-sqrt(2));
    ddmmba=roicolor(dmbas,0,1);nbas=sum(ddmmba);
    ddmmbb=roicolor(dmbbs,0,1);nbbs=sum(ddmmbb)-1;
    vecinosb(k,:)=[k nbas nbbs iba(1) ibb(2)];

```

```

mindistb(k)=dmmbb(2);mindistba(k)=dmmba(1);
end
dmmbb =sort(mindistb);dmmba=sort(mindistba);
indb=(1:1:length(dmmbb));indba=(1:1:length(dmmba));
%indb=indb';indba=indba';
indb=indb/length(dmmbb);indb=1-indb;
indba=indba/length(dmmba);indba=1-indba;

[C ia ic]=unique(vecinosb(:,4),'rows');
vecb=vecinosb(ia,:);
[C ia ic]=unique(vecb(:,5),'rows');
vebb=vecb(ia,:);

%cálculo de A libre
clustera=vecinosa(:,2)+ vecinosa(:,3);
cla=roicolor(clustera,0);alibre=sum(cla)

%cálculo de B libre
clusterb=vecinosb(:,2)+ vecinosb(:,3);
clb=roicolor(clusterb,0);
blibre=sum(clb)

%Cómputo de los pares AB y de los dímeros A2 y B2
% Se toma el criterio de que molécula de A rodeada por mayor cantidad de
% moléculas similares es un dímero A2, mientras que en caso contrario,
es
% un par AB (si tiene igual nro de A que de B o si no tiene A)
%Una situación simétrica se usa para B
bconvec=vecinosb(find(roicolor(clusterb,1,100)),:);
aconvec=vecinosa(find(roicolor(clustera,1,100)),:);
bmenosa=aconvec(:,3)-aconvec(:,2);
amenosb=bconvec(:,2)-bconvec(:,3);
sa=sign(bmenosa);sb=sign(amenosb);
pa=[sum(roicolor(sa,-1)) sum(roicolor(sa,0)) sum(roicolor(sa,1))];
pb=[sum(roicolor(sb,-1)) sum(roicolor(sb,0)) sum(roicolor(sb,1))];
paresa=(pa(1)+pa(2)/2)/2
paresb=(pb(1)+pb(2)/2)/2
paresab=(pa(2)/2+pa(3)+pb(3)+pb(2)/2)/2

%Esta porción calcula la distribución de distancias en una muestra
%aleatoria de la misma densidad de A y de B para graficarlas como marco
de
%referencia

for k=1:Na;
darbr=((brn(1,:)-arn(1,k)).^2+(brn(2,:)-arn(2,k)).^2).^(1/2);
[dmabr,iarbr]=sort(darbr);
mindistarbr(k)=dmabr(1);
end
dmarbr =sort(mindistarbr);dmabr=dmarbr(1:Na-1);
indarbr=(1:1:length(dmarbr));
indarbr=indarbr/length(dmarbr);iarbr=indarbr(1:(Na-1));iarbr=1-iarbr;

for k=1:Nb;
```

```
    dbrar=((brn(1,k)-arn(1,:)).^2+(brn(2,k)-arn(2,:)).^2).^(1/2);
    [dmbar,ibrar]=sort(dbrar);
    mindistbrar(k)=dmbar(1);
end
dmbrar =sort(mindistbrar);dmbar=dmbrar(1:Nb-1);
indbrar=(1:1:length(dmbrar));
indbrar=indbrar/length(dmbrar);ibrar=indbrar(1:(Nb-1));ibrar=1-ibrar;

pab=polyfit(dmabr.^2,log10(iarbr),1);
calarbr=pab(1)*(dmabr.^2)+pab(2);

pba=polyfit(dmbar.^2,log10(ibrar),1);
calbrar=pba(1)*(dmbar.^2)+pba(2);

figure(2)
plot(dma.^2,log10(indab),'ro',dmmab.^2,log10(indab),'rx',dmmba.^2,log10(i
ndba),'bx',dmmbb.^2,log10(indb),'bo');figure(gcf)
hold on
plot(dmabr.^2,calarbr,'r',dmbar.^2,calbrar,'b');figure(gcf)
hold off

end
```

Apéndice IV: Funciones de distribución de primeros vecinos

En lo que sigue se analizará la distribución de moléculas cuando están situadas en dos dimensiones (2D), como puede ser una muestra homogénea esparcida sobre una superficie y analizada por microscopía, o cuando están situadas en una dimensión (1D) como puede ser el caso de moléculas asociadas a fibrilas.

Luego se introducirá la función de distribución acumulada complementaria (FDAC) y se demostrará por qué es una representación adecuada para nuestros fines.

Análisis para distribución de distancias

Este análisis se centra en la distribución para muestras al azar. Esta situación tiene resolución exacta y puede servir de marco para saber si una distribución es aleatoria o no.

Se aplicará a la distancia mínima entre dos moléculas de diferente naturaleza a fin de saber si existe afinidad entre ellas o no, más allá de la distribución uniforme.

Si se suponen moléculas distribuidas uniformemente en un intervalo lineal (1D) de longitud L , la función de distribución para una partícula es:

$$f(x) = 1/L$$

Esto significa que, si hay N partículas en total en el intervalo de longitud L , el número de partículas entre dos puntos a distancia a y b es:

$$n_{(b-a)} = \frac{N}{L} \cdot (b - a)$$

Ahora se quiere hallar la probabilidad, a partir de un punto cualquiera, de que el primer vecino se encuentre a una distancia x_0 . Para esto es necesario que no haya ninguna partícula entre 0 y x_0 y que la primera se encuentre a x_0 . Si se supone que estos eventos son independientes, entonces, se multiplican las probabilidades. Si subdividimos el intervalo $[0, x_0]$ en M intervalos suficientemente pequeños como para que haya una probabilidad despreciable de encontrar dos partículas, entonces:

$$P_1 = \frac{N}{L} \cdot \frac{x_0}{M} \quad P_0 = 1 - P_1$$

La probabilidad de no encontrar ninguna partícula entre 0 y x_0 es:

$$P_0(x_0) = \lim_{M \rightarrow \infty} \left(1 - \frac{N}{L} \cdot \frac{x_0}{M}\right)^M = \exp\left(-\frac{N}{L} \cdot x_0\right)$$

La probabilidad de encontrar una partícula a x_0 es un valor constante que surge de normalizar la distribución de distancias.

De esta forma, la probabilidad de encontrar el primer vecino a una distancia x es:

$$P_0(x) = \frac{N}{L} \cdot \exp\left(-\frac{N}{L} \cdot x\right)$$

La función de distribución de probabilidades acumulada complementaria, $F(x)$ se define como:

$$F(x) = 1 - \int_0^x P_0(r) \cdot dr = \exp\left(-\frac{N}{L} \cdot x\right)$$

En una distribución aleatoria unidimensional, $\ln[F(x)]$ debería ser lineal con x .

En forma similar, la distribución del primer vecino en una distribución aleatoria bidimensional está dada por:

$$W(r) = 2 \cdot \pi \cdot D \cdot r \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot 2 \cdot \pi \cdot D \cdot r^2\right)$$

Donde D es la densidad de moléculas por unidad de área. Esta distribución tiene un máximo a una distancia

$$r_{max} = \frac{1}{(2 \cdot \pi \cdot D)^{1/2}}$$

El análisis y deducción de esta distribución se puede ver en:

http://www.atmo.arizona.edu/students/courselinks/spring13/atmo589/ATMO489_online/lecture_19/lect19_nearest_neighbor_dist.html

Para una distribución aleatoria 2D, $F(x)$ es una Gaussiana:

$$F(x) = K \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot (r/r_{max})^2\right)$$

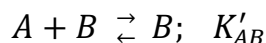
Por esto un gráfico de $\ln(F(x))$ vs r^2 , debería ser una recta si la distribución es aleatoria 2D.

Finalmente, para una distribución aleatoria en 3D, por un razonamiento análogo se obtiene:

$$W_3(r) = 4 \cdot \pi \cdot D \cdot r^2 \cdot \exp\left(-\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \cdot D\right)$$

Simulación:

En código Matlab se implementaron algoritmos que ubican moléculas de uno o de dos tipos en superficie o en escenarios de fibras tortuosas, dejando la posibilidad de que pueda existir afinidad entre ellas. Esta se cuantifica a través de la constante de equilibrio para la asociación:



Pero se puede dar el caso que existan o no otras afinidades como K'_{AA} o K'_{BB} .

A partir de la generación de las posiciones se encuentra la mínima distancia desde cada una de las moléculas a otras de la misma, o de otra especie y se construyen, en el caso general, las cuatro FDAC: $f_{AA}(r)$, $f_{AB}(r)$, centradas en cada molécula de tipo A, y $f_{BA}(r)$, $f_{BB}(r)$, centradas en cada molécula de tipo B.

Influencia de la agregación en diferentes escenarios

Trama fibrosa (1D)

En base al código mencionado se simularon dos casos: uno con k_d (equivalente a K'_{AB}) extremadamente pequeña (cero en la práctica ya que no se predice la existencia de pares) y otro con $k_d = 10^{-3}$. A continuación se presenta el código utilizado y, posteriormente, los resultados obtenidos para ambos casos.

dmem5.m

```
function dcell13(Nc,Na,Nb,kd)
```

```
%Esta función simula distribución aleatoria de moléculas dentro de
%compartimentos de tipo filamentos. Estos se generan en un número Nc en
forma
%aleatoria dentro de un cuadrado de píxeles dado por la vairable tam(1) y
%tam(2).
% Se distribuyen dos tipos de moléculas, unas al azar y la otra en parte
en
% las localizaciones cercanas a las primeras y las otras al azar.
% La constante kd determina cuántas moleculas están formando pares.
% Luego calcula la distancia de primeros vecinos de cada molécula y lo
% grafica en forma de distribución acumulada complementaria en función del
% cuadrado de esa distancia
```

```
%Se crean los compartimentos
tam=[250 250];
a=ceil(tam(1)*rand(1,Nc));
b=ceil(tam(2)*rand(1,Nc));
ss=ones(1,length(a));
PP=sparse(a,b,ss,tam(1),tam(2));
```

```
PP=full (PP);
sdi=strel ('disk',10);
sd2=strel ('disk',8);
PP1=imdilate (PP,sdi);
PP2=imdilate (PP,sd2);
PP=PP1-PP2;
PP=roicolor (PP,1,10);
imagesc (PP)
pos=sum (sum (PP))
pause

% Se ubican Nb puntos al azar y luego los puntos A sobre ellos hasta la
% proporción que marque la constante de asociación Kd

Nab=(kd*(Na+Nb)+1)/(2*kd)-(((kd*(Na+Nb)+1)/(2*kd))^2-Na*Nb)^(1/2);
Nab=round(Nab)
bb=[ceil(tam(1)*rand(1,Nb));ceil(tam(2)*rand(1,Nb))];
for k=1:Nab
    aa(1,k)=ceil(bb(1,k)+round(3*(rand-0.5)));
    aa(2,k)=ceil(bb(2,k)+round(3*(rand-0.5)));
end

for k=Nab+1:Na
    aa(1,k)=ceil(tam(1)*rand);aa(2,k)=ceil(tam(2)*rand);
end
aar=roicolor(aa,1,tam(1));
sa=sum(aar);sar=roicolor(sa,2);
ind=find(sar);
az=[aa(1,ind);aa(2,ind)];
ssa=ones(1,size(az,2));ssb=ones(1,Nb);
DDa=sparse(az(1,:),az(2,:),ssa,tam(1),tam(2));
DDb=sparse(bb(1,:),bb(2,:),ssb,tam(1),tam(2));
DDa=full(DDa);DDb=full(DDb);
DDa=DDa.*PP;DDb=DDb.*PP;
sa=sum(sum(DDa))
sb=sum(sum(DDb))
[a1,a2]=find(DDa);[b1,b2]=find(DDb);
Na1=length(a1);Nb1=length(b1);

ssa=ones(1,Na1);ssb=ones(1,Nb1);
PPa=sparse(a1,a2,ssa,tam(1),tam(2));
PPb=sparse(b1,b2,ssb,tam(1),tam(2));
PPa=full(PPa);PPb=full(PPb);
sda=strel ('square',3);
PP1=imdilate(PPa,sda);
PP2=imdilate(PPb,sda);
PPx=PP1+2*PP2;
imagesc (PPx);pause

%Se encuentra la distancia entre primeros vecinos y se grafica la
%distribución para la distancia entre moléculas iguales y diferentes

%Cálculo de distribución de primeros vecinos entre moléculas de A y de A
%hacia B
```

```

for k=1:Na1;
    d=( (a1-a1(k)).^2+(a2-a2(k)).^2 ).^(1/2);
    d2a=( (b1-a1(k)).^2+(b2-a2(k)).^2 ).^(1/2);
    da=sort(d);dab=sort(d2a);
    mindista(k)=da(2);mindistab(k)=dab(1);end
dma =sort(mindista);dmab=sort(mindistab);
inda=(1:1:length(dma));indab=(1:1:length(dmab));
inda=inda/length(dma);inda=1-inda;
indab=indab/length(dmab);indab=1-indab;

%Cálculo de distribución de primeros vecinos entre moléculas de B y de B
%hacia A
for k=1:Nb1;
    d2=( (b1-b1(k)).^2+(b2-b2(k)).^2 ).^(1/2);
    d2b=( (a1-b1(k)).^2+(a2-b2(k)).^2 ).^(1/2);
    db=sort(d2);dba=sort(d2b);
    mindistb(k)=db(2);mindistba(k)=dba(1);end
dmb =sort(mindistb);dmba=sort(mindistba);
indb=(1:1:length(dmb));indba=(1:1:length(dmba));
indb=indb/length(dmb);indb=1-indb;
indba=indba/length(dmba);indba=1-indba;
figure(1)
plot(dma.^2,log10(inda),'ro',dmb.^2,log10(indb),'bo',dmab.^2,log10(indab),
'rx',dmba.^2,log10(indba),'bx');figure(gcf)
pause
figure(2)
plot(dma,log10(inda),'ro',dmb,log10(indb),'bo',dmab,log10(indab),'rx',dmba,
log10(indba),'bx');figure(gcf)

```

Primer caso:

```
>> dmem5(200,2000,2000,1e-7)
```

En este escenario se localizaron en una trama unidimensional de 10834 píxeles (sobre un total de 250 x 250 = 62500 píxeles en 2D) 353 moléculas de A y 339 de B de manera aleatoria. Tanto la distribución de localizaciones como las curvas logarítmicas de FDAC en función de la distancia y la distancia al cuadrado se muestran en la Figura 4.28 (Capítulo 4).

Segundo caso:

```
>> dmem5(200,2000,2000,1e-3)
```

En este caso, hay 11715 pixeles abarcados por la trama, donde se localizaron 365 moléculas de A y 402 de B, con un 50% de moléculas asociadas. En la Figura AIV.1 se presentan las localizaciones y las FDAC obtenidas en función de la distancia y del cuadrado de la misma. Al comparar las curvas

con las de la Figura 4.28, las diferencias se observan en las funciones cruzadas f_{AB} y f_{BA} , como una más rápida disminución a valores bajos de distancia, debido a los pares formados por afinidad. Valores de k_d menores a $1e-4$ no muestran una diferencia apreciable con $1e-7$ en las FDAC.

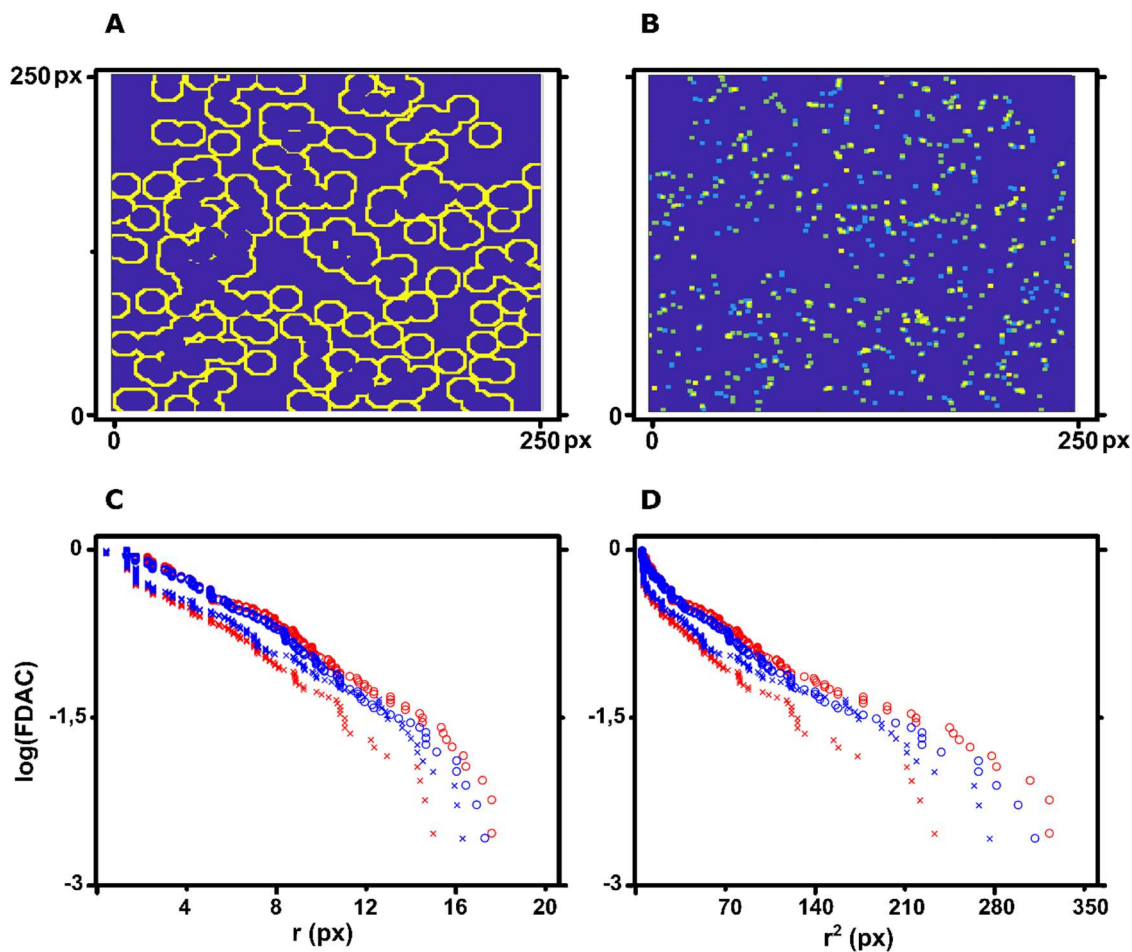


Figura AII.1. Simulación de una distribución aleatoria 1D para moléculas tipo A y B. (A) Espacio utilizado (región amarilla). (B) Localizaciones distribuidas al azar: 365 moléculas de A (celeste) y 402 de B (verde). El amarillo corresponde a píxeles colocalizados por azar. (C) Curvas logarítmicas de FDAC en función de la distancia. Cruces rojas: f_{AB} ; cruces azules: f_{BA} ; círculos rojos: f_{AA} ; círculos azules: f_{BB} . (D) Ídem (C), pero en función del cuadrado de la distancia. Las referencias de los símbolos son las mismas que en (C).

Distribución en una superficie (2D)

En una distribución aleatoria en dos dimensiones se cumple lo predicho para el cambio de la pendiente en forma proporcional a la densidad, cuando se representa $\text{Log}(f_{AA}(r))$ vs r^2 . En la Figura 4.29 (Capítulo 4) se muestran 5 curvas, con incremento de la densidad desde 100 moléculas hasta 1600 en una trama de 250 x 250 puntos. Se representa $\text{Log}(f_{AA}(r))$ vs r^2 , donde se verifica el incremento del módulo de la pendiente con la densidad. Las distribuciones se generaron con el siguiente código:

```
function separa (Na)
% La rutina genera puntos en posiciones al azar
% dentro de un cuadrado de 250 x 250 puntos, distribuidos con probabilidad
% constante.
%Identifica la distancia de mínima aproximación para cada molécula,
%partiendo de las que hay en menor cantidad.
% Genera y grafica el histograma de distribución de distancias
% La salida del programa es: un gráfico con la posición de los dos tipos
% de
% puntos, el histograma de distancias en forma de matriz y gráfica.
dim=[250 250];
a=[ceil(dim(1)*rand(1,Na));ceil(dim(2)*rand(1,Na))];
mindist=zeros(Na,2);
for k=1:Na;
    d=((a(1,:)-a(1,k)).^2+(a(2,:)-a(2,k)).^2).^(1/2);
    [da,i]=sort(d);
    mindist(k,1)=i(2);mindist(k,2)=da(2);
end
dm =sort(mindist);
dist=dm(:,2);ind=(1:1:length(dist));
ind=ind';
ind=ind/length(dist);ind=1-ind;
figure(1);
plot(dist.^2,log10(ind),'ro');figure(gcf)
```

Finalmente, se puede analizar el caso de dos tipos de moléculas que se asocian con constantes K'_{AB} , K'_{AA} y K'_{BB} en un escenario bidimensional. Para ello, se utilizó el código descrito en el Apéndice III.

En la sección 2.5.2.2 del Capítulo 4 se utilizaron estos conceptos para calcular las FDAC experimentales y compararlas con un caso simulado con constantes similares a las obtenidas en la sección 2.5.2.1 del mismo capítulo, hallándose una buena concordancia entre ambas situaciones.

A Pedro, por ser un excelente director y una gran persona. Por acompañarme en este arduo camino de trabajo de tesis. De él aprendí muchísimo a nivel científico, siempre trabajando de manera conjunta y pudiendo discutir todos los temas de forma abierta y desprejuiciada. Le agradezco el tiempo dedicado a mi tesis, su calidad humana y el hecho de preocuparse por el futuro del sistema científico, apoyando las distintas luchas contra los recortes que viene sufriendo el mismo.

A Susana, por dirigir con gran entusiasmo la pata biológica de esta tesis y mostrar interés en comprender las técnicas de microscopía que manejamos en el CIBION. Por estar siempre dispuesta a discutir, escuchar y proponer nuevos experimentos. Fue muy gratificante hacer un trabajo interdisciplinario con su grupo.

A Luciana, por ayudarme con la síntesis en los primeros años. Sufrimos bastante con los pirroles y el aza-BODIPY, pero finalmente el trabajo dio sus frutos. Por la buena onda que siempre tuvieron ella y Santi, tanto en el ámbito laboral como en el personal.

A Maru, por enseñarme todo sobre HPLC y espectrometría de masa, y por confiarme el equipo desde el primer momento. Por compartir la alegría cuando pude detectar mis compuestos después de tanto trabajo. Por la paciencia y el excelente trato.

A Fernando, por armar el laboratorio de microscopía del CIBION y poner a disposición su conocimiento para montar los nanoscopios juntando las distintas piezas necesarias, con excelentes resultados. Por aportar su visión crítica a los resultados de mi trabajo de tesis.

A Sara por abrir las puertas de su laboratorio, ayudarme con la síntesis y estar siempre dispuesta a discutir los resultados en profundidad. Aprendí mucho con ella sobre el trabajo con pirroles y en atmósfera inerte.

A Teresa Atvars y Marcelo Faleiros, por su aporte al trabajo de esta tesis midiendo espectros de emisión a bajas temperaturas.

A Claudio Cavasotto por su aporte a través de los estudios de *docking*. A Nati por ayudarme a entender estos temas y revisar críticamente lo que escribí al respecto.

A Verónica Sánchez, por realizar los cálculos mostrados en el Capítulo 3 de esta tesis.

A Nati, por trabajar conmigo codo a codo en buena parte de mi tesis. Por su actitud y predisposición a la hora de trabajar, pero también por ser una gran persona, alegre, dispuesta a ayudar desinteresadamente a cualquier/a compañero/a. Fueron muchas jornadas largas de trabajo, en las que aprendí muchísimo sobre técnicas y sobre el sistema de estudio. Le agradezco también por la revisión crítica de parte de mi tesis.

A Caro, por haberme ayudado en la primera parte de la tesis con los experimentos biológicos. Por el buen trato recibido y por estar dispuesta a ayudar con lo que hiciera falta. Su tesis fue de gran ayuda para entender la importancia de CRH/CRHR1.

A Pau y a Sergio, por enseñarme cuestiones básicas (y no tanto) de técnicas de laboratorio y cultivo.

A los/as becarios/as del CIBION les agradezco por aguantarme todos estos años, y por haber formado un gran grupo. El apoyo de todos/as en las tomas del MinCyT, los desayuno-debate, las birras y asados. Pero hay más motivos para agradecerles:

A Fede, por el setup de STORM y el ya internacional Tormenta, que me facilitaron muchísimo el trabajo a la hora de tomar imágenes. Por enseñarme a alinear un láser, a montar un dicroico, etc. Por tener una paciencia infinita.

A Lucho, por estar siempre dispuesto a ayudar cuando algo falla en el STORM y tener esa pasión docente que le permite explicar todo de manera muy clara.

A Juli, por los mates, y por haberme enseñado con el ejemplo a ser perseverante. Por tener siempre esa curiosidad y sentido crítico que tanto cuesta sostener en el tiempo.

A Anto, Iani, Chechu, Jesi, Cata y Helen, por la increíble onda que le pusieron estos 3-4 años a la sala de becarios/as y a los encuentros fuera del trabajo.

A Migue, por haber compartido grupo durante más de un año, tiempo suficiente para hacerme divertir muchísimo y permitirme conocer un gran amigo.

A Nati B., con quien arrancamos a la par en el CIBION y vivimos el paso de ser 4-5 a lo que es hoy, con todo lo que eso implica.

A Anita, por su alegría y predisposición a ayudar a todos/as.

A los/as que me agarraron más quemado en mi etapa final de la tesis, pero que hicieron que sea súper agradable ir al CIBION: Emi, los Nico, Lean, Juan, Nacho, Ara, Peter, Lei, Bruno, Flor, Andy y Juanma.

Al resto de trabajadores/as del CIBION, con quienes compartí docencia (Leo), pasión por hacer birra (Ariel), o simplemente buenos momentos.

A mis amigos/as y compañeros/as del primer año y pocos meses en INQUIMAE, especialmente a Pol, Nico, Mati y Sergio. La pasamos muy bien.

A Sabri y Bea, que me recibieron de la mejor manera cuando empecé a trabajar con Pedro y me enseñaron cuestiones básicas de trabajo en laboratorio de óptica. Son dos personas increíbles, con una pasión muy grande por lo que hacen.

A Vir, que me introdujo en el mundo de la investigación en mi etapa de estudiante de grado y me enseñó mucho sobre fotoquímica. También por su ayuda y cariño más allá de lo estrictamente laboral, y por ser una gran persona y una trabajadora ejemplar.

A Betty y Gabriela, por su pasión por la ciencia y la docencia, y su predisposición permanente a ayudar al otro/a.

A Ale y Claudia, por tenerme paciencia y facilitarme muchísimos trámites, por su buena onda y predisposición.

A mis amigos/as de toda la carrera, con quienes formamos un muy lindo grupo.

A Vero, por estar siempre, hasta en las últimas horas de escritura. Por ser una amiga increíble y auténtica. Estoy seguro que seguiremos pasando etapas juntos/as.

A Lean, por ser un amigo con el que siempre puedo contar. Por haber compartido muchos lindos momentos, viajes y años de confianza y amistad.

A Nico, Pau, Lau, Lu y Mica, por preocuparse por mí y saber que, aunque haya rachas de largos ratos sin saber del otro/a, eso es algo circunstancial. Les quiero mucho.

A todo el grupo: a Ale y sus buenos-malos tratos (que en el fondo son siempre buenos), Nacho, Javi, May, Vero, Pol, Sergio, Fla.

A los pibes, mis amigos de toda la vida, por ser un sostén fundamental para mí. Saben todo lo que los quiero y lo importante que son, pero no quiero dejar de agradecerles estar siempre (siempre siempre). Quito, Negro, Manu, Ben, Nico, Mono, Pablito y Gon, son muy capos.

A mis compañeros/as de militancia, con quienes peleamos desde JCP durante años para ir ganando derechos laborales, en el camino a ser reconocidos/as como trabajadores/as. A los/as compañeros/as de AGD, ATE, CDP, Brecha, IPPM, TDA, ASL y de distintos espacios con los que me fui encontrando en estos años, por luchar por un mundo más justo, sin saqueo y contaminación, injusticias, explotación, patriarcado ni opresión.

A los/as que amo, pero sé que no podrán leer estas palabras: las gatitas Milpa y Bibop, perrita Uma y perrito Gorka. Por ser seres tan hermosos y compañeros/as.

A mi familia, que es muy numerosa, por darme tanto cariño desde que soy pequeño y acompañarme en estos años de tesis. Son muchísimos y todos/as me dan una fuerza enorme. Paty, Zoecita, Jorge, Belí, Soli, primos de Catamarca (Eze, Ober, y muchos/as más), Gus, tías y tíos en Catamarca y el sur... si tuviese que nombrar a todos/as no termino más, pero saben todo lo que les quiero y agradezco.

A la Pocha y la Bicha. A ellas les debo una parte muy grande de lo que soy. Cada una fue una segunda madre para mí y lo siguen siendo. Las amo demasiado.

A Dai, por todo. Por ser mi compañera, por apoyarme en todos los subibajas que pasé en estos 5 años de tesis, por leerme todos los capítulos, pero sobre todo por darme tantos momentos de felicidad compartida. Esa felicidad que no puedo explicar en palabras, pero que no quisiera que se termine nunca. Sos una persona demasiado hermosa. Te amo muchísimo y gracias por todito.

A Gaby, por los 30 años juntos/as, creciendo en infinitos aspectos, pero siempre muy muy unidos/as. Por ser la mejor hermana que podía tener, por contar conmigo para lo que sea y estar siempre para lo que necesite. Amor de hermanos/as que seguirá existiendo siempre. A Ro también le agradezco, por amarte y ser tu compañero de vida.

A papá y a mamá, por ser los principales responsables de que haya podido llegar hasta acá. Por darme todo en la vida, pero más que nada por darme mucho amor. Todo lo que soy se lo debo a ellos. A mi pa, por inculcarme la importancia de tener sentido crítico, y por apoyarme siempre en mis decisiones de vida. Sé que estaría contento de ver este trabajo. A la Viei, por enseñarme muchísimas cosas con el ejemplo, por el amor, por enseñarme a ser fuerte, y por apoyarnos a mí y a Gaby cuando flaqueábamos. A ambos les amo muchísimo y les agradezco todo.

A la Educación Pública que me formó y a la que siempre habrá que defender en las calles, luchando para que llegue realmente a toda la población.

A las instituciones públicas que apoyaron y financiaron esta tesis.